

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



25

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM ÜBERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :

C12N 15/82, 15/63, 5/10, A01H 5/00

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/26388

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

11. Mai 2000 (11.05.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE99/03432

(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Oktober 1999 (27.10.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 52 195.2

4. November 1998 (04.11.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT  
FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN-  
FÖRDERUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466  
Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEIM, Ute [DE/DE];  
Wasserstrasse 1, D-06466 Gatersleben (DE). WEBER,  
Hans [DE/DE]; Heinrichstrasse 11, D-06484 Quedlinburg  
(DE).

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10,  
D-13125 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,  
LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO  
Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,  
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: NOVEL EXPRESSION CASSETTE FOR EXPRESSING GENES IN PLANT SEED

(54) Bezeichnung: NEUE EXPRESSIONSKASSETTE ZUR EXPRESSION VON BELIEBIGEN GENEN IN PFLANZENSAMEN

(57) Abstract

The invention relates to an expression cassette for expressing genes in plant seed and to the plasmids containing said expression cassette. The invention includes the production of transgenic plant cells containing said expression cassette and the use of the plasmids in said expression cassette for producing transgenic plants. The invention can be applied in the field of biotechnology, pharmaceuticals and plant production. The aim of the invention is to provide a means for the seed-specific expression in transgenic plants in such a manner that it is suitable for the production of the desired substances. Another aim of the invention is to construct an expression cassette which allows stable expression of genes of substances to be produced in plant seed at a high expression rate. The inventive expression cassette comprises the following essential components: the promoter of the gene of the seed protein which is analogous to the sucrose binding protein (SBP), optionally the DNA sequence of a signal peptide, preferably that of the SBP signal peptide, a gene to be expressed, 3' termination sequences.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen und die die Expressionskassette enthaltenden Plasmide. Die Erfindung schliesst die Herstellung transgener Pflanzenzellen, die diese Expressionskassette enthalten, sowie die Verwendung der Plasmide in dieser Expressionskassette zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit ein. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Pharmazie und die Pflanzenproduktion. Die Erfindung hat das Ziel, die samenspezifische Expression in transgenen Pflanzen auf eine für eine Stoffproduktion geeignete Basis zu stellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, eine Expressionskassette zu konstruieren, mit der eine stabile Expression mit hoher Expressionsrate von Genen der herzustellenden Stoffe in Pflanzensamen erreicht werden kann. Die erfindungsgemässe Expressionskassette enthält folgende wesentlichen Bestandteile: den Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins; ggf. die DNA-Sequenz eines Signalpeptids, bevorzugt des SBP-Signalpeptids; ein zu exprimierendes Gen; 3'-Terminationssequenzen.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	CN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## Neue Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen

### Beschreibung

5

10

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen und die die Expressionskassette enthaltenden Plasmide. Die Erfindung schließt die Herstellung transgener Pflanzenzellen, die diese Expressionskassette enthalten, sowie die Verwendung der Plasmide in dieser Expressionskassette zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit ein. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Pharmazie und die Pflanzenproduktion.

15

20

25

30

35

Seit langem gibt es Methoden, die es ermöglichen, relevante Gene in das Genom höherer Pflanzen einzuschleusen. Ziel dieser Arbeiten ist die Herstellung von Pflanzen mit neuen Eigenschaften, zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktion, der Optimierung der Lebensmittelherstellung und der Produktion bestimmter Pharmazeutika und anderer interessanter Inhaltsstoffe. Eine Voraussetzung für die Expression der übertragenen Gene ist dabei, daß sie über pflanzenspezifische Promotorsequenzen verfügen. So werden dazu bereits sogenannte konstitutive Promotoren wie der Promotor des Nopalinsynthase - Gens /1/ , der TR - Doppelpromotor /2/ oder der Promotor des 35S - Transkriptes des Blumenkohl - Mosaikvirus /3/ verwendet. Ein Nachteil dieser Promotoren ist es, daß sie in fast allen Geweben der manipulierten Pflanzen aktiv sind. Dadurch ist eine kontrollierte und gezielte Expression der Fremdgene in den Pflanzen nicht möglich. Es ist besser, Promotoren zu benutzen, die gewebespezifisch und entwicklungsabhängig funktionieren. So wurden Gene mit den dazu gehörigen Promotoren isoliert, die nur in Antheren, Ovarien, Blüten, Blättern, Laubblättern, Stengeln, Wurzeln oder Samen aktiv sind /4/. Sie unterscheiden sich aber sehr in der Stärke und

Spezifität der Expression und sind nur begrenzt einsetzbar. Für die Nutzung der Samen als Ernährungsquelle und zur Produktion von Inhaltsstoffen sind vor allem die samenspezifischen Promotoren von großem Interesse. Durch die langjährige Erforschung der Gene der Samenspeicherproteine stehen schon einige mehr oder weniger spezifische und in der Stärke unterschiedliche Promotoren, wie beispielsweise des Phaseolins /5/ oder des Legumins und USP /6/ zur Verfügung. Da diese Speicherproteine von Genfamilien synthetisiert werden, stehen Fusionen solcher Promotoren mit Fremdgenen in Konkurrenz zu den endogenen zahlreichen Genen der entsprechenden Genfamilie. Deshalb ist es günstiger, Promotoren von unikal, stark und spezifisch exprimierenden Genen zu benutzen. Für Ko- und Mehrfachtransformationen ist die Verwendung verschiedener regulatorischer Sequenzen angebracht, um die zeitliche Entwicklung des Samens besser auszunutzen, parallel gleiche oder verschiedene Genprodukte zu synthetisieren und um Kosuppression zu vermeiden.

Obwohl also bereits mehrere Expressionskassetten zur Expression beliebiger Gene in Pflanzensamen bekannt sind, waren die erreichten Expressionsraten in Pflanzensamen bisher noch nicht optimal, um darauf eine pflanzenbiotechnologische Produktion der gewünschten Stoffe zu begründen.

Die Erfindung hat daher das Ziel, die samenspezifische Expression in transgenen Pflanzen auf eine für eine Stoffproduktion geeignete Basis zu stellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, eine Expressionskassette zu konstruieren, mit der eine stabile Expression mit hoher Expressionsrate von Genen der herzustellenden Stoffe in Pflanzensamen erreicht werden kann.

Die Zielstellung der Erfindung wird mit der in Anspruch 1 beschriebenen Expressionskassette erreicht, die Unteransprüche 2-7 sind Vorzugsvarianten.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette enthält folgende wesentlichen Bestandteile:

- o den Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins
- 5 o ggf. die DNA-Sequenz eines Signalpeptids, bevorzugt des SBP-Signalpeptids
- o ein zu exprimierendes Gen
- o 3'-Terminationssequenzen

10 Die Erfindung bezieht sich vor allem auf eine unikal im Genom vorkommende regulatorische DNA - Sequenz, die eine starke Expression eines beliebigen heterologen Gens im wesentlichen in den Keimblättern und im Endosperm von Samen entwicklungsabhängig vermittelt.

15 Der wichtigste Bestandteil der Kassette ist der SBP-Promotor, dessen Sequenz in der Abb. 1 dargestellt ist. Dieser Promotor hat gegenüber analogen Promotoren auf diesem Gebiet den Vorteil großer Stärke und Samenspezifität. Seine Nutzung für die Expression von Fremdgenen auch ohne die DNA-Sequenz eines Signalpeptids gehört ebenfalls zum Umfang der Erfindung.

20 Die Expressionskassette enthält neben den transkriptionell regulatorischen Sequenzen ggf. auch ein Signalpeptid, welches den Transport des gewünschten Genproduktes in die Proteinkörper ermöglicht und so einen Abbau der Genprodukte weitgehend verhindert. Die wahlweise Nutzung des  
25 authentischen Signalpeptids ermöglicht den Transport des synthetisierten Fremdproteins zu und die Lagerung in den Proteinbodies.

30 Die zu exprimierenden Gene können entweder als Transkriptions- oder als Translationsfusionen integriert sein, sie können weitgehend variiert werden, beispielsweise können Gene für die Produktion von Enzymen (z.B. Amylase, Xylanase), pharmazeutischer Produkte oder für die  
35 Überexpression von Proteinen mit einem hohen Anteil essentieller Aminosäuren (z.B. methioninreiches 2S Globulin der Brasilnuß) oder anderer die Eigenschaften der Samen

beeinflussender Proteine eingesetzt werden. Weitere Möglichkeiten liegen in der Reduzierung oder im Ausschalten von Genprodukten durch die Integration von Genen in antisense Orientierung. Durch den Einbau regulatorischer Gene unter Kontrolle dieses samenspezifischen Promotors können auch Stoffwechselprozesse im Samen beeinflusst werden. Die Kassette kann ebenfalls benutzt werden, um das dem Promotor eigene SBP Gen aus der Ackerbohne in anderen Spezies zu exprimieren. Die Nutzung anderer Terminatoren, so zum Beispiel die Terminationsequenz des zu exprimierenden Gens, ist eine weitere Möglichkeit, um die Kassette optimal einzusetzen. Als konkretes Beispiel wurde das Gen der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) genutzt, um die Spezifität des Promotors zu zeigen (Abb. 2b,c).

Die Nukleotidsequenz der Expressionskassette enthält transkriptional regulatorische Bereiche, die eine starke spezifische Expression eines beliebigen Gens in den Samen von Pflanzen gewährleistet. Der Northern (Abb. 2a) zeigt die hohe samenspezifische Expression in den verschiedenen Geweben von *Vicia faba*. Die GUS-Daten in den Abb. 2b und 2c zeigen zum einen in den Schnitten durch reifen Tabaksamen die Verteilung der  $\beta$ -Glucuronidase und zum anderen die entwicklungsabhängige Akkumulation der  $\beta$ -Glucuronidase in den transgenen Tabaksamen.

Unter Schutz gestellt werden auch die Plasmide, welche die Expressionskassette enthalten, bevorzugt die Plasmide pSBPROCS und pPTVSBPRGUS.

Zum Umfang der Erfindung gehört auch die Verwendung der Expressionskassette gemäß Ansprüchen 12-16, die durch Transformation in Bakterienstämme und anschließendem Transfer der entstandenen rekombinanten Klone in vorzugsweise dicotyle Pflanzen erfolgt. Die das gewünschte Genprodukt im Samen exprimierenden Pflanzen werden selektiert und als genetisch stabile Linien gezüchtet. Nach der Ernte werden dann die

gewünschten Genprodukte aus den transgenen Samen in an sich bekannter Weise extrahiert.

5 Diese Erfindung ist auch interessant für Anwendungen, wo das gewünschte Genprodukt unter der Kontrolle verschiedener Promotoren exprimiert wird, um die Expressionsraten in der Summe zu erhöhen, um den Entwicklungszeitraum der Samen besser zu nutzen und um Effekte durch Kosuppression zu vermeiden. Für Ko- und Mehrfachtransformationen mit dem  
10 Ziel, verschiedene Genprodukte zu exprimieren, ist diese Expressionskassette ebenfalls geeignet. Für diese Strategien benötigt man eine Vielzahl neuartiger Expressionskassetten, um die richtigen auswählen zu können.

15 Das gesamte Verfahren zur Veränderung einer Pflanzenzelle wird an einem Beispiel (pSBPOCS) dargestellt.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

20

### Methoden

#### 1. Klonierungsverfahren

25 Zur Klonierung wurden die Vektoren pUC18 /7/, pBK-CMV (Stratagene) und pOCS1 (Plant Genetic Systems, Gent, Belgien) und für die Pflanzentransformation die Vektoren BIN19 /8/, sowie nach Deletion des GUS Gens pGPTV-BAR /9/, verwendet.

#### 2. Bakterienstämme

30 Für die Transformation in E. coli wurde der Stamm DH5 $\alpha$  /10/ verwendet. Durch Konjugation wurden die Binärplasmide in den Agrobakterienstamm EHA105 /11/ eingeführt.

#### 3. Pflanzentransformation

35 Die Transformation von Nicotiana tabaccum erfolgte durch die Blattscheibchenmethode /12/ und die Transformation von Vicia

narbonensis mit Hilfe der von Pickardt 1991 beschriebenen Methode /13/ über Agrobakterien vermittelten Gentransfer.

4. Analyse genomischer DNA aus transgenen Pflanzen
- 5 Die genomische DNA der transgenen Tabak und V. narbonensis Pflanzen wurde mit Hilfe des DNA - Isolierungskit der Firma Macherey & Nagel isoliert. In einem ersten Schritt wurden die transgenen Linien über PCR mit genspezifischen Primern identifiziert. Die Integration der Fremd-DNA wurde mittels
- 10 "Southernblot" - Analysen von 20µg DNA nach geeigneter Restriktionsspaltung untersucht.

5.  $\beta$ -Glucuronidase - Aktivitätstest (GUS - Assay)
- Das Reportergen  $\beta$ -Glucuronidase ist ein bakterielles Enzym,
- 15 das sowohl quantitativen /14/ als auch histochemischen Aktivitätsbestimmungen zugänglich ist. Gewebeproben wurden in 1mM X-Gluc, 50mM Na-Phosphat (pH 7,0) und 0,1% Tween 20 über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Schnitte wurden die Gewebe fixiert, in Paraffin eingebettet und am Mikrotom auf
- 20 15 - 30 µm Schnittdicke geschnitten.

#### Ausführungsbeispiele

- Die Erfindung, die die Herstellung einer neuen
- 25 samenspezifischen Expressionskassette enthält sowie die sich daraus ableitenden Plasmide und transgenen Pflanzen, wird nachstehend - zum Teil an Hand von den Abbildungen - an einem Ausführungsbeispiel erläutert.

- 30 1.) Klonierung und Strukturanalyse eines SBP - Samenprotein - Gens aus Vicia faba
- Von der Sequenz eines cDNA Klons, der für das Saccharosebindeprotein aus der Sojabohne kodiert /15/, wurden
- 35 Primer (5'-GAAGACCCTGAGCTCGTAACTTGCAA-ACAC- 3' und 5'-AGTACTCATAGATCTCTGGGTGATGTTGGT-3') abgeleitet. Mittels RT - PCR an mRNA, isoliert aus unreifen Kotyledonen von V. faba, wurde dann die genspezifische Sonde amplifiziert, kloniert



und sequenziert. Das PCR - Produkt wurde als dem Saccharosebindeprotein homologes Genfragment identifiziert und diente als Sonde für die Isolierung der vollständigen cDNA aus einer Kodyledonon spezifischen  $\lambda$  Zap Express cDNA Bank aus *V. faba* L. var. minor. Einer der isolierten Klone (VfSBP20), der auf Nukleotidebene eine Homologie von 68% hat, kodiert für das vollständige SBP homologe Gen aus der Ackerbohne. Es unterscheidet sich aber sowohl in der Expression (Abb.2a) als auch in der Funktion (keine Saccharosebindung) von dem aus der Sojabohne isoliertem Gen.

2) Isolierung der regulatorischen Sequenzen mittels PCR  
Die regulatorischen Sequenzen wurden mit Hilfe des "Universal GenomeWalker™ Kit" der Firma CLONTECH und den genspezifischen Primern PSBP1, Position 159 (5'-AATCCTCA-CAGTTCTCCATGCATATCCGTTTGTCC-3'), PSBP2, Position 118 (5'-GCCCTGCAGAT-CGCATTTGTCTTTTGCA-3') und PSBP3, Position 85 (5'-CTGGGTCCTTTTCTTTTCTGG-C-3') isoliert. Nach vorheriger Spaltung der genomischen DNA von *V.faba* mit ScaI (a) bzw. StuI (b) und Ligation der Adaptoren wurde entsprechend der Beschreibung des Kits eine Zweischritt - PCR nach folgenden Parametern durchgeführt: 7 Zyklen a' 94°C, 2s, 72°C, 3 min und 32 Zyklen a' 94°C, 2s, 67°C, 3 min und 4min 67°C. Die PCR - Ansätze wurden 1:50 verdünnt und jeweils 1µl in einer zweiten PCR (5 Zyklen a' 94°C, 2s, 72°C, 3 min und 20 Zyklen a' 94°C, 2s, 67°C und 4min bei 67°C amplifiziert. Im Agarosegel konnten Banden von 1,7kb aus (a) und 1,9kb aus (b) über einen Southernblot verifiziert werden. Diese Banden wurden dann in den pUC18 kloniert und sequenziert. Die Klone SBPR7 und SBPR15 konnten dann durch Sequenzvergleich als die zum Gen VfSBP20 zugehörigen Promotoren identifiziert werden. Sie stellen allelische Varianten des Gens VfSBP20 dar, wobei beide Klone 100% Sequenzidentität im entsprechenden Bereich zum Klon VfSBP20 aufweisen. 5'seitig vom ATG des SBP Gens sind mit dem Klon SBPR7 1539bp und mit dem Klon SBPR15 1750bp isoliert worden. Sie unterscheiden sich durch 23 Basenpaarsubstitutionen und zwei Insertionen. Die

Restriktionskarte der Klone pSBPR7 und pSBPR15 sind in Abb. 3, die Sequenz des Klons pSBPR15 ist in Abb. 1 wiedergegeben.

5 3a) Nachweis der samenspezifischen Expression in Tabak  
Mit Hilfe des Reportergens der  $\beta$ -Glucuronidase sollte die  
samenspezifische Expression der isolierten regulatorischen  
Sequenzen SBPR7 und SBPR15 überprüft werden. Dazu wurde das  
Binärplasmid pBI101 /14/, welches das promotorlose  
10 Glucuronidase Gen hinter einem Polylinker enthält, mit SmaI  
geschnitten und dephosphoryliert. Aus den Plasmiden pSBPR7  
bzw. pSBPR15 wurden mittels einer SalI/NcoI Spaltung die  
Promotoren isoliert und die Enden geglättet. Die Fragmente  
wurden dann in den SmaI - Ort des Binärplasmides pBI101 vor  
15 das Reportergen kloniert, wobei die Plasmide pBISBPR7GUS und  
pBISBPR15GUS entstanden sind. Diese Plasmide wurden dann in  
den Agrobakterienstamm EHA105 transferiert und die chimären  
SBP-Promotor/Glucuronidase Gen enthaltenen Agrobakterien für  
die Transformation von Tabak eingesetzt. Die Ergebnisse sind  
20 in Figur 2b und 2c abgebildet. Die Analyse der transgenen  
Tabaksamen zeigt eine starke Blaufärbung und damit eine  
starke Aktivität der Glucuronidase im Endosperm und in den  
Keimblättern der Tabaksamen auch entsprechend der  
Samenentwicklung. In anderen Geweben konnte keine  
25 Glucuronidaseaktivität nachgewiesen werden. Auch  
unterscheiden sich die beiden leicht verschiedenen  
Nukleotidsequenzen SBPR7 und SBPR15 nicht in ihrem  
Expressionsverhalten. Diese Daten zeigen, daß die isolierten  
regulatorischen Sequenzen, die mit dem  $\beta$ -Glucuronidase Gen  
30 fusioniert wurden, eine starke und streng samenspezifische  
Expression im Tabak vermitteln.

3b) Nachweis der samenspezifischen Expression in der Erbse  
Um zu zeigen, daß auch in den Leguminosen mit einer  
35 samenspezifischen Expression zu rechnen ist, wurde das  
SalI/NcoI Fragment des Plasmids pSBPR15 in das SalI/NcoI  
geschnittene Plasmid pGUS1 (Plant Genetic Systems, Gent)

kloniert. Aus dem resultierenden Plasmid pSBPGUS wurde mit SalI/SmaI die Fusion des SBPR15 Promoters/GUS/ocs-Terminator ausgeschnitten, geglättet und in das Binärplasmid pGPTV-Bar, EcoRI/SmaI geschnitten, ligiert (Abb.4) . pGPTV-Bar /9/ ist ein Phosphinithricin-resistenz vermittelndes Binärplasmid, welches erfolgreich für die Transformation von Erbsen eingesetzt wird. Dieses Plasmid wurde pPTVSBPRGUS (Abb.4) genannt. Die Embryonen der mit diesem Plasmid erzeugten transgenen Erbsenlinien zeigen eine starke Blaufärbung nach histochemischer Analyse.

3c) Nachweis der transienten Expression in Embryonen von *Vicia faba*, *Vicia narbonensis*, *Pisum sativum* und *Brassica napus*

Mit dem Plasmid pSBPGUS wurden isolierte Embryonen von *Vicia faba*, *Vicia narbonensis*, *Pisum sativum* und *Brassica napus* mittels dem Biolistics PDS-1000/He Particle Delivery System unter folgenden Bedingungen beschossen. Der Coating-Ansatz bestand aus 50µl Gold (Hereaus, 0,6-3µm, 50mg/ml), 10µl Qiagen gereinigte Plasmid-DNA (1µg/µl), 50µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> und 10µl 0,1M Spermidine. Bei 1800 Psi und einem Vakuum von 27 inch Hg wurden dann die auf einer Agarplatte liegenden Embryonen beschossen, die anschließend in MS-2% Sucrose Flüssigmedium für 2 Tage kultiviert wurden. Dann erfolgte die Reaktion mit X-Gluc (1mM) in 50mM Na-Phosphat (pH 7,0) und 0,1% Tween 20 über Nacht bei 37°C. Im Gegensatz zur Negativkontrolle (promoterloses pGUS1) konnten viele blaue Punkte bei den obengenannten Embryonen registriert werden, die zeigen, daß der SBP-Promoter in den Samen funktioniert.

4.) Herstellung der Expressionskassette zur Überexpression von heterologen Genen in Samen

Um die regulatorischen Sequenzen für die Überexpression von Fremdgenen verfügbar zu machen, wurde das SalI Fragment des längeren Klons SBPR15 isoliert und geglättet und in den SmaI Ort des Plasmides pOCS1 (Plant Genetic Systems, Gent, Belgien) kloniert. Diese Kassette enthält somit die

Promotorregion, die vollständige 5' untranslatierte Region, das vollständige Signalpeptid, die ersten fünf Triplets des reifen Proteins (Abb. 1) und den 3' untranslatierten Bereich mit den Polyadenylierungssignalen des Octopin Synthase Gens (Fig.5). Für Transkriptionsfusionen mit Fremdgenen kann der NcoI-Ort, für Translationsfusionen der BamHI -Ort genutzt werden. Nach erfolgter Insertion des Fremdgens wird die den Promoter, regulatorische Sequenzen, das Fremdgen und die 3'-Terminationssequenzen enthaltene Sequenz mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in einen Binärvektor mit der für die Pflanzentransformation geeigneten Herbizidresistenz kloniert.

Als Beispiel dafür wurde das BamHI-Fragment des Gens der XylanaseZ von *Clostridium thermocellum* in den BamHI-Ort des Plasmids pSBPOCS als Translationsfusion kloniert. Aus dem resultierenden Plasmid pSBPRXYNZ (Abb. 6) wurde das geglättete Asp718/SphI Fragment mit dem mit den Enzymen EcoRI/SmaI geschnitten und geglätteten Binärvektor pGPTV-Bar ligiert. Nach Transformation in den Agrobakterienstamm EHA105 wurde *N. Tabacum* transformiert. In den reifen transgenen Samen konnte im Western Blot die starke Expression der Xylanase Z gezeigt werden (Abb. 7).

25

#### Literatur:

1. Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) *Nature*, 303, No. 5914, 209-213.
2. Velten, J., Velten, L., Hani, R. and Schull, J. (1984) *EMBO J.* 3, 2723-2730.
3. Koziel, M.G., Adams, T.L., Hazlet, M.A., Damm, D., Miller, J., Dahlbeck, D., Jayne, S. and Staskawicz, B.J. (1984) *Journ. of Molec. and Appl. Genet.* 2, 549-562.
4. Goldberg, R.B. (1986) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B314, 343-353.
5. Hall, T. C. et al (1996) US Patent 5,504,200
6. Conrad, U. et al. (19-- ) deutsches Patent DE 196 04 588.6

35

7. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Gene, 33, 103-119.
8. Bevan, M. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 8711-8720.
9. Becker, D., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. (1992) Plant Mol. Biol. 20, 1195-1197.
- 5 10. Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580.
11. Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) Transgenic. Res. 2, 208-218.
- 10 12. Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Bassüner, R., Van Montagu, M., Inze, D. and Wobus, U. (1991) Mol Gen. Genet, 225, 459-467.
13. Pickardt, T., Meixner, M., Schade, V. and Schieder, O. (1991) Plant Cell Report, 9, 535-538.
14. Jefferson, R.A. (1987) Plant Molec. Biol. Rep. 5, 387-405.
- 15 15. Grimes, H.D., Overvoorde, P.J., Ripp, K., Franceschi, V.R. and Hitz, W.D. (1992) The Plant Cell, 4, 1561-1574.

## Patentansprüche

1. Neue Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen  
in Pflanzensamen bestehend aus
  - 5 o dem Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-  
ähnlichen Samenproteins
  - o ggf. der DNA-Sequenz eines Signalpeptids, bevorzugt des  
SBP-Signalpeptids
  - o einem zu exprimierenden Gen
  - 10 o 3'-Terminationssequenzen
2. Expressionkassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß sie den SBPR-Promotor mit der Sequenz entsprechend Abb.1  
15 ohne DNA-Sequenz eines Signalpeptids enthält.
3. Expressionkassette nach Anspruch 1 und 2, dadurch  
gekennzeichnet, daß der mit einer transkriptional  
regulatorischen Sequenz für eine starke samenspezifische  
20 Genexpression versehenen DNA - Region eine weitere DNA Sequenz  
nachgeschaltet ist, die die Information für die Bildung und  
mengenmäßige Verteilung endogener Produkte oder die Expression  
heterologer Produkte in Kulturpflanzen enthält.
- 25 4. Expressionkassette nach Anspruch 1 bis 3, dadurch  
gekennzeichnet, daß beliebige -Fremdgene entweder als  
Transkriptions- oder als Translationsfusionen integriert sind.
5. Expressionkassette nach Anspruch 1 bis 4, dadurch  
30 gekennzeichnet, daß das Signalpeptid des SBP - Samenprotein -  
Gens als Signalpeptid verwendet wird.

6. Expressionskassette nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als das zu exprimierende Gen das Gen des Saccharosebindeprotein verwandte Gen eingesetzt wird.
- 5 7. Expressionskassette nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß sie auch für Ko- und Mehrfachtransformationen eingesetzt wird.
- 10 8. Plasmide enthaltend eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1-5.
9. Plasmid pSBPROCS, bestehend (enthaltend?) aus einer etwa 5,3kb großen DNA Sequenz, in der ein etwa 1,9kb großes SalI - Promoterfragment des regulatorischen Starterbereichs inklusive des Signalpeptides und 5 Tripletts des SBP homologen Gens aus Vicia-faba, Restriktionsorte zum Einklonieren von Fremdgenen und der Transkriptionsterminator des Octopinsynthasegens enthalten sind.
- 15 10. Plasmid pPTVSBPRGUS, bestehend (enthaltend?) aus einer ca. 14,9kb großen DNA-Sequenz, in der ein etwa 1kb großes Phosphinothricin - Resistenzgen, ein etwa 1,8kb großes SalI/NcoI-Promoterfragment des regulatorischen Starterbereiches des SBP homologen Gens aus Vicia faba, die etwa 2kb große kodierende Region der  $\beta$  - Glucuronidase und der Transcriptionsterminator des Octopinsynthasegens enthalten sind.
- 20 25
11. Verfahren zur Einführung einer Expressionskassette mit einer DNA-Sequenz zur starken samenspezifischen Genexpression in eine Pflanzenzelle, das folgende Schritte beinhaltet:
- 30 a) Isolation des Klons VfSBP20, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen, welches für das in Pflanzensamen vorkommende SBP - Samenprotein kodiert, aus einer cDNA Bank von Kotyledonen von Vicia faba selektiert wird,

- 5 b) Isolation des Klons pSBPR15, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltende DNA Sequenz die regulatorische Starterregion des SBP - Samenprotein - Gens aus *Vicia faba* bzw. eine mit der DNA-Sequenz des SBPR15 hybridisierende Sequenz aus einer verwandten Leguminose enthält,
- c) Herstellung des Plasmids pSBPOCS unter Verwendung des 1,9kb großen SalI Fragments des Plasmid pSBPR15.
- 10 d) Integration von Fremdgenen in die Expressionskassette pSBPOCS,
- e) Klonierung der Expressionskassette, die eine DNA-Sequenz enthält zur Überexpression von Fremdgenen in Pflanzensamen, in Binärvektoren
- 15 f) Transfer der Expressionskassette, die ein Fremdgen unter der Kontrolle des SBPR Promoters enthält, in eine Pflanzenzelle.

20 12. Verwendung einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 zur Expression homologer und heterologer Gene in Samen transformierter Pflanzen.

25 13. Verwendung einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 zur Expression von Genen, die die Lagereigenschaften oder die Keimfähigkeit von Samen verändern.

14. Verwendung der Plasmide pBISBPR7, pBISBPR15, pSBPGUS, pPTVSBPRGUS und pSBPOCS oder Derivate davon zur Transformation von Kulturpflanzen.

30 15. Verwendung der Plasmide pBISBPR7, pBISBPR15, pSBPGUS, pPTVSBPRGUS und pSBPOCS oder Derivate davon zur Regulation endogener Prozesse oder zur Herstellung heterogener Produkte in Kulturpflanzen.



16. Verwendung einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß die transformierten Pflanzen, die im Samen veränderte oder neue Genprodukte exprimieren, selektiert, genetisch stabile Linien gezüchtet und die Genprodukte aus den Samen der transgenen Pflanzen extrahiert werden.
17. Pflanzenzelle, enthaltend ein Plasmid gemäß Anspruch 8 - 10.
- 10 18. Pflanzenzelle, hergestellt nach dem Verfahren des Anspruchs 11.
19. Pflanze oder pflanzliche Gewebe, regeneriert aus einer Pflanzenzelle gemäß der Ansprüche 12 oder 13.
- 15 20. Pflanze gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kulturpflanze ist.

## Abb. 1

ATCCAACCTTCTGATCTTTGAATCTCTCTGTTCCAACATGTTCTGAAGGAGTCTTAAGACTTTTCAGAAAGCTTGTAAACAT  
GCTTTGTAGACTTTCTTTGAATTACTCTTGCAAACTCTGATTGAACCTACGTGAAAACTGCTCCAGAAAGTTCTAACCACAAA  
TTCCGCTCTGGGAAGGCCAAAATTTATTGAGTACTTCAGTTTCATGGACGTGCTTCAAAGATTTATAACTTGAAATCC  
CATCATTTTAAAGAGAAGTCTGTTCCGCAATGTCTTAGATCTCATTGAAATCTACAACCTCTTGTGTGAGAAAGTTCTTCC  
AGAAACAACCTTGCAATCATGGTGAAAATCTGGCCAGAAAGTTCTGAACTTGTCTATATTTCTTAACAGTTAGAAAAATTTCTA  
AGTGTTTAGAATTTTGACTTTTCCAAGCAAACTTGACTTTTGACTTCTTAATAAACAACAACTTCATATTTCTAACATGT  
CTTGATGAAATGTGATCTTGAAATTTGATGTTGATGCAAAAGTCAAAGTTTGACTTTTCAGTGTGCAATTTGACCATTTT  
GCTCTTGTCCTAATCCAAACCTAAATTTGATGATCAGTGTGCAAACTTGATGTCATGGAAGATCTTATGAGAAAAATTC  
TTGAAGACTGAGAGGAAAAATTTGTAGTACAACAAAAATCCTGTTTTTCATAGTCGGACTAGACACATTAACATATA  
AACACCACTTCATTCGAAGAGTGATTGAAGAAGGAAATGTGCAGTTACCTTTCTGCAGTTCATAAGAGCAACTTACAGAC  
ACTTTTACTAAAATACTACAAAAGAGGAAGATTTAACAACTTAGAGAAAGTAATGGGAGTTAAAGAGCAACACATTAAGGG  
GGAGTGTTAAAAATTAATGTGTTGTAAACCACCACTACCTTTAGTAAGTATTATAAGAAAAATTGTAATCATCACATTATAAT  
TATTGTCCCTTATTTAAAAATTAATGATAAAAGTTGTATCATTAAGATTGAGAAAAACCAATAGTCCCTGCTTGATTTTGAA  
TTATTGTTTTCTATGTTACTTTTCTCAAGCCCTATAAAAACTTTGTAATGCTAAATTTGTAATGCTGGAAAAAAATGTGT  
AATGAAATTCATAGAAATTAATGGTATTTCAAAGTCCAAAATCCATCAATAGAAATTTAGTACAAAACGTAACTCAAAAAT  
ATTCTCTTATTTTAAATTTTACAACAATATAAAAAATATCTCTTATTTTAAATTTTACAATAATAATTTATCACCTGT  
CACCTTAGAATACCCCAACAATATTAATACTTAGATAATTTTATTTCTTAATAATTTTGAGATCTCTCAATATATCTGAT  
ATTTATTTTATATTGTGTCATATTTTCTTATGTTTTAGAGTTAACCCCTTATATCTTGGTCAAACTAGTAAATTTCAATATA  
TGAGTTTGTGAAGGACACATTGACATCTTGAAACATTTGGTTTAAACCTTGTGGAAATGTTAAAGGTAATAAAACATTCAG  
AATTATGACCATCTATTAAATATACTTCCCTTTGTCTTTTAAAAAGGTGTCATGAAATGCTCTATGGTAAGCTAGAGTGT  
CTTGCTGGCCTGTATATCAATTCCATTTCCAGATGGTAGAAACTGCCACTACGAAATAATTAGTCATAAGACACACGTATG  
TTAACACACAGTCCCTTGTCATGTTTTTGCCATATATTCCGTCTCTTTCTTTTCTCACGTATAAAACAATGAACATAAT

## SBP - Samenprotein

## Hindi

**NcoI**

NCOI  
ATG GCG ATT AAA ACA AAG CTT TCC TTA ACC ATC TTT CTT TTC CTC TTA GCT TTA CTA TGC  
M A I K T K L S L T I F L F L A L L C  
BamHI XbaI ocs term.

ocs term.

TCA AAC TTA GCC ATA GCC AGA  
S N L A I A R

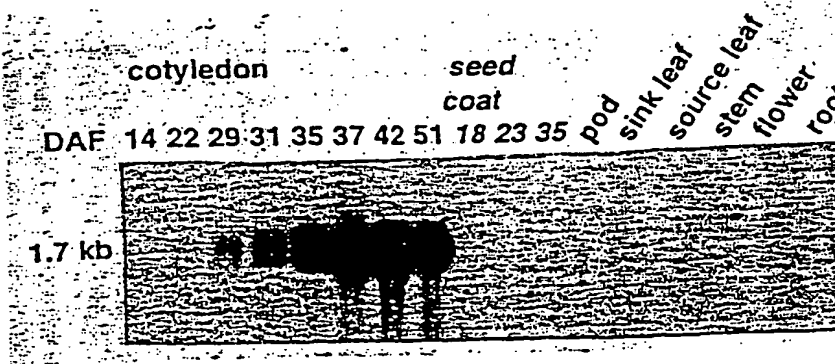
---

AAA GAA AAG GAC GGG ATC CAT CTA GAG TCC TGC TTT AAT GAG  
K E E D G I Q L E F C F N E

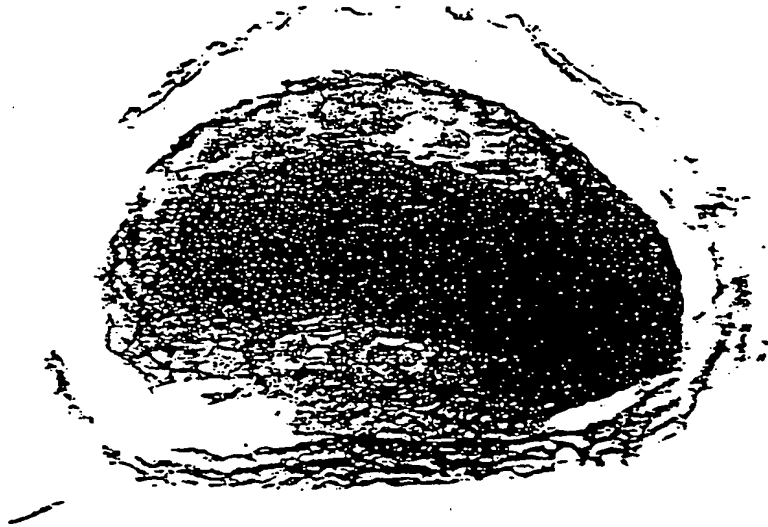
25

Abb. 2

2/7

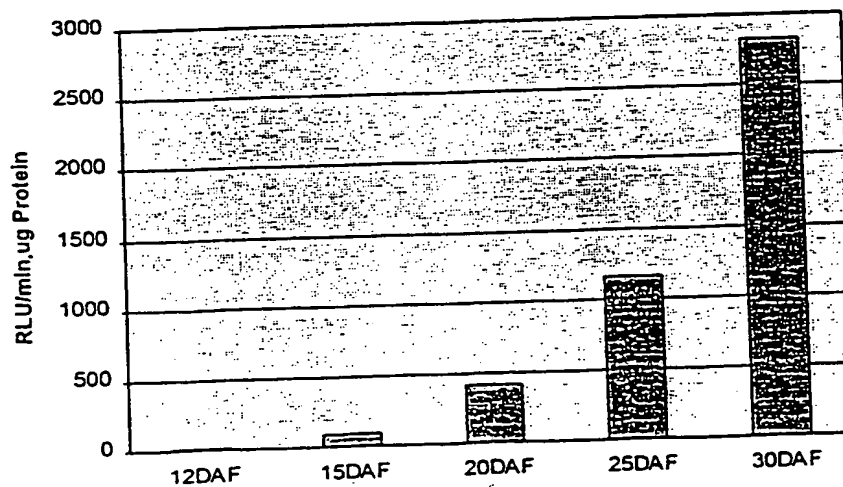


2a) Northern V. faba RNA gegen VfSBP20 Sonde,



2b) Schnitt durch reife transgene (SBPRGUS) Tabaksamen

GUS Gehalt in transgenen pSBPRGUS Tabak Linien  
(n=15)



2c)

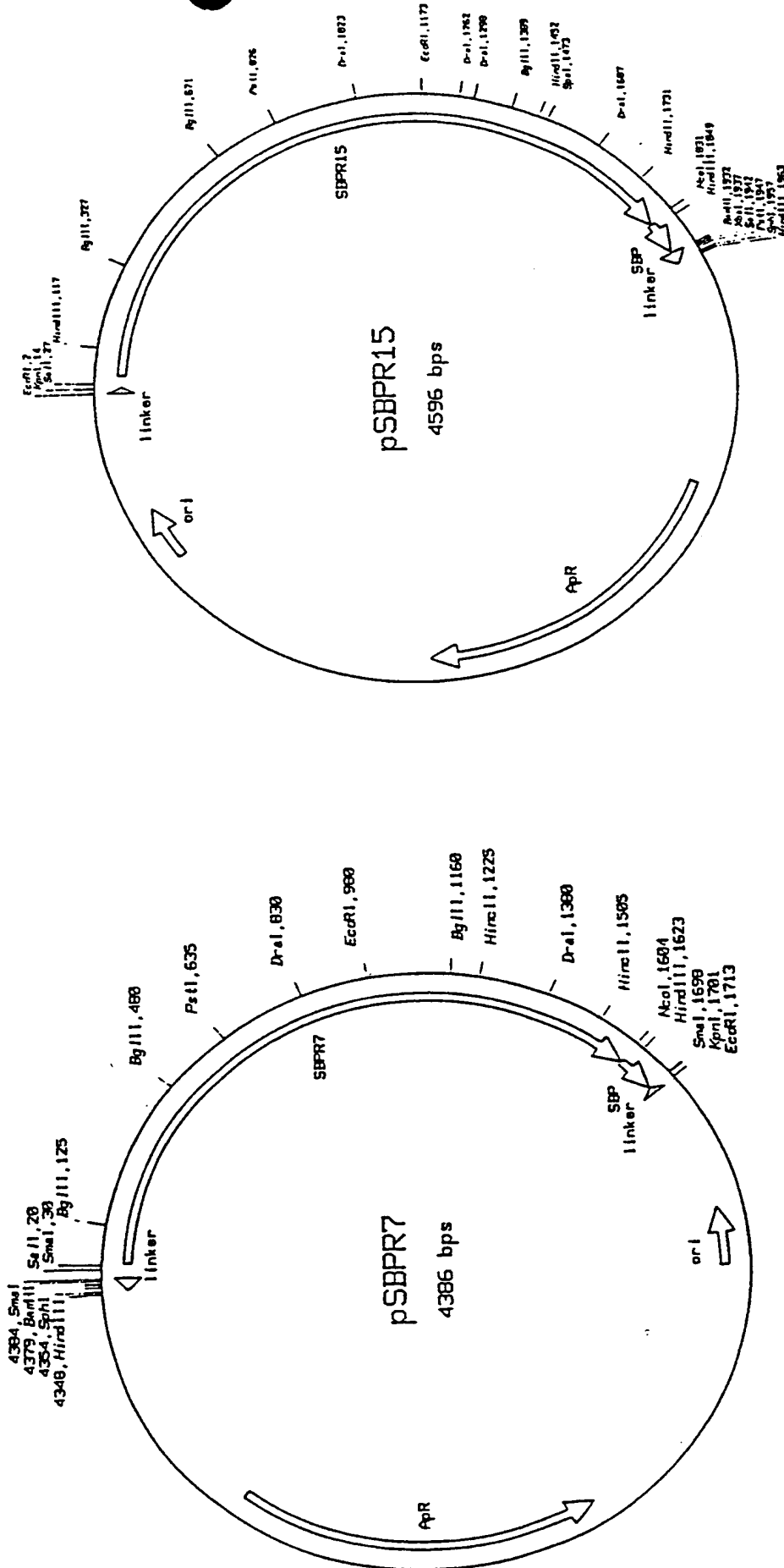


Abb. 3

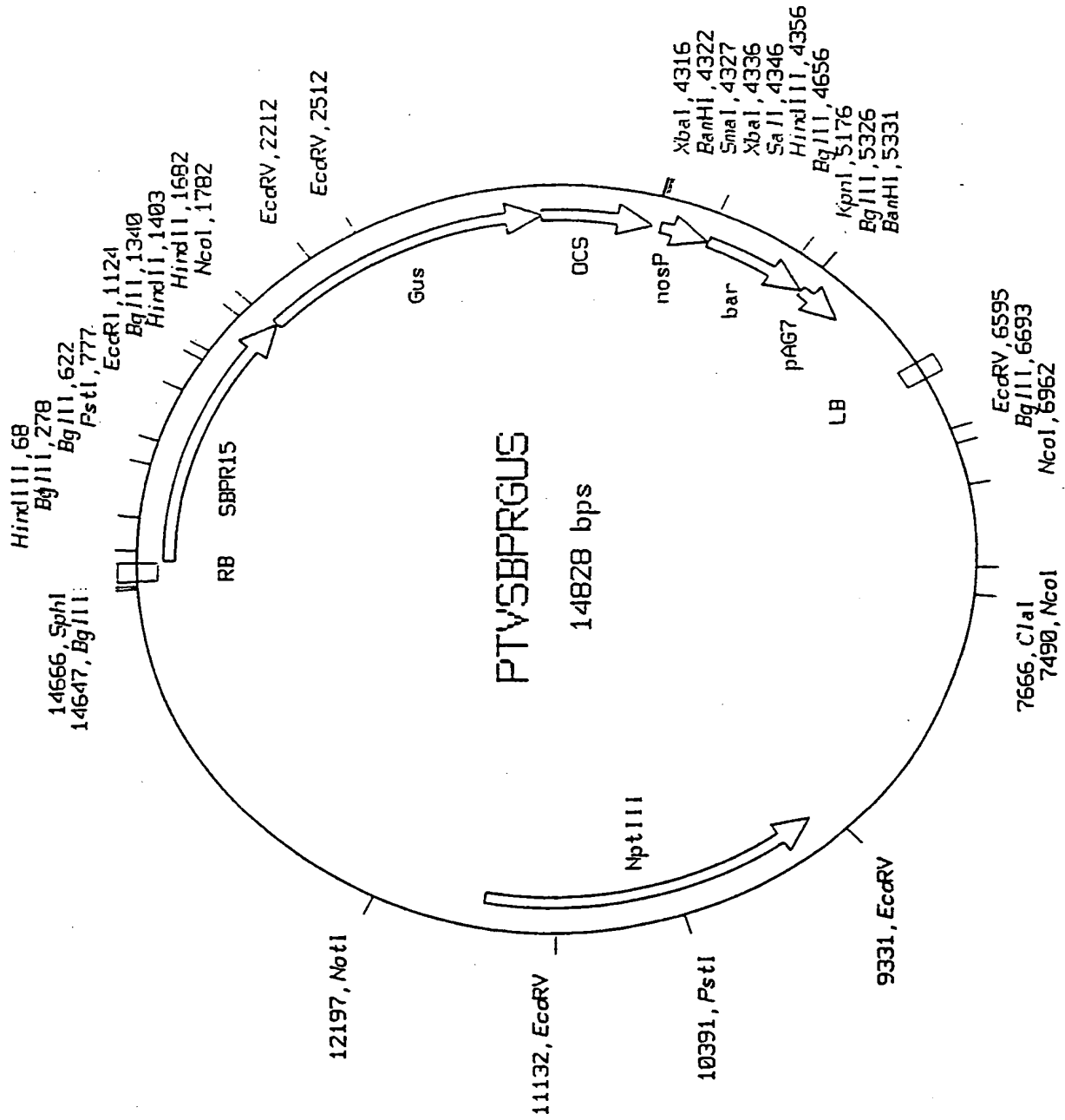


Abb. 4

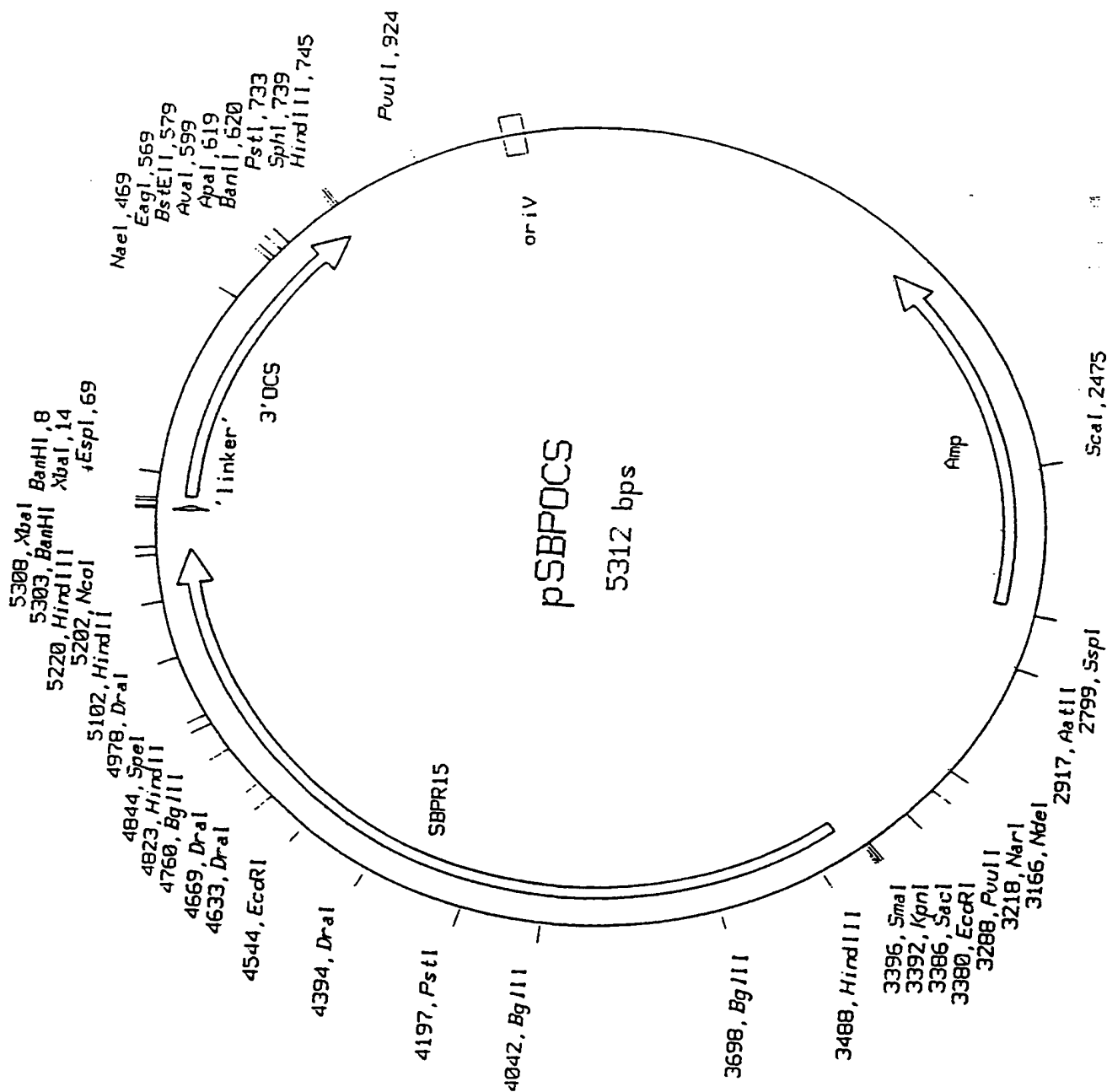


Abb. 5

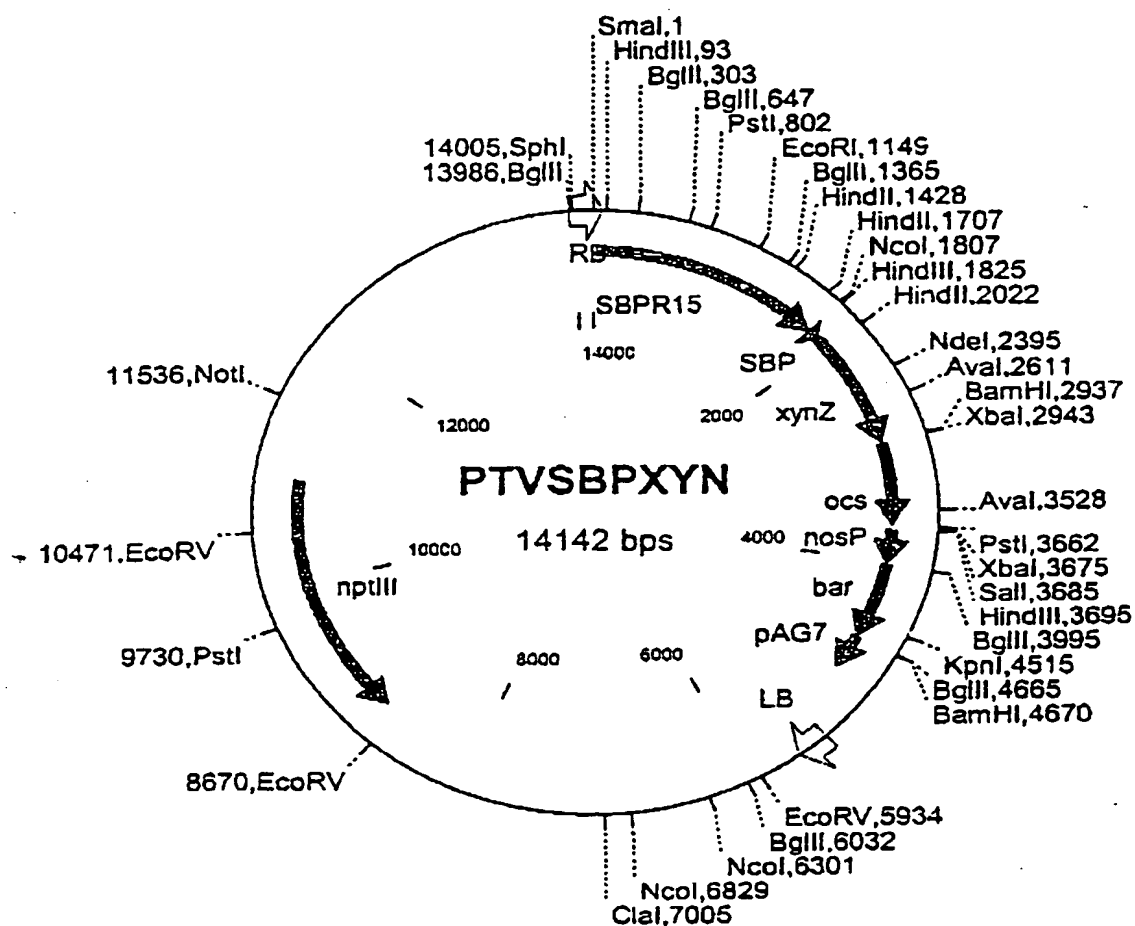
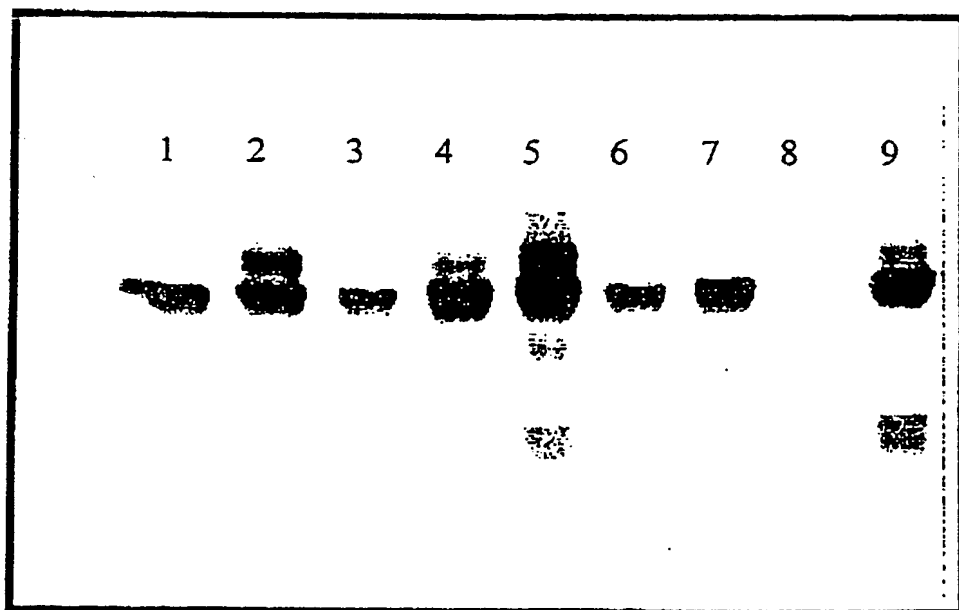


Abb. 6



**Abb. 7: Western Blot von Proteinextrakten aus reifen Samen mit gegen Xylanase Z gerichteten Antikörper:**

**1-7 unabhängige mit dem Plasmid PTVSBPXYN transformierte *N. tabacum* Linien; 8 Wildtyp; 9 positiv Kontrolle**



**PCT**ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 7 :</b> <b>C12N 15/82, 15/63, 5/10, A01H 5/00</b>		<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/26388</b>
			<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 11. Mai 2000 (11.05.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE99/03432		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 27. Oktober 1999 (27.10.99)		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 52 195.2      4. November 1998 (04.11.98)      DE		<b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 3. August 2000 (03.08.00)	
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZEN-FOR- SCHUNG [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> HEIM, Ute [DE/DE]; Wasserstrasse 1, D-06466 Gatersleben (DE). WEBER, Hans [DE/DE]; Heinrichstrasse 11, D-06484 Quedlinburg (DE).			
<b>(74) Anwalt:</b> BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			

**(54) Title:** NOVEL EXPRESSION CASSETTE FOR EXPRESSING GENES IN PLANT SEED**(54) Bezeichnung:** NEUE EXPRESSIONSKASSETTE ZUR EXPRESSION VON BELIEBIGEN GENEN IN PFLANZENSAMEN**(57) Abstract**

The invention relates to an expression cassette for expressing genes in plant seed and to the plasmids containing said expression cassette. The invention includes the production of transgenic plant cells containing said expression cassette and the use of the plasmids in said expression cassette for producing transgenic plants. The invention can be applied in the field of biotechnology, pharmaceutics and plant production. The aim of the invention is to provide a means for the seed-specific expression in transgenic plants in such a manner that it is suitable for the production of the desired substances. Another aim of the invention is to construct an expression cassette which allows stable expression of genes of substances to be produced in plant seed at a high expression rate. The inventive expression cassette comprises the following essential components: the promoter of the gene of the seed protein which is analogous to the sucrose binding protein (SBP), optionally the DNA sequence of a signal peptide, preferably that of the SBP signal peptide, a gene to be expressed, 3' termination sequences.

**(57) Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen und die die Expressionskassette enthaltenden Plasmide. Die Erfindung schliesst die Herstellung transgener Pflanzenzellen, die diese Expressionskassette enthalten, sowie die Verwendung der Plasmide in dieser Expressionskassette zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit ein. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Pharmazie und die Pflanzenproduktion. Die Erfindung hat das Ziel, die samenspezifische Expression in transgenen Pflanzen auf eine für eine Stoffproduktion geeignete Basis zu stellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, eine Expressionskassette zu konstruieren, mit der eine stabile Expression mit hoher Expressionsrate von Genen der herzustellenden Stoffe in Pflanzensamen erreicht werden kann. Die erfindungsgemässe Expressionskassette enthält folgende wesentlichen Bestandteile: den Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins; ggf. die DNA-Sequenz eines Signalpeptids, bevorzugt des SBP-Signalpeptids; ein zu exprimierendes Gen; 3'-Terminationssequenzen.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No

PCT/DE 99/03432

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N15/63 C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEIM U ET AL: "Cloning and characterization of full-length cDNA encoding sucrose phosphate synthase from faba bean" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, vol. 178, no. 1, 31 October 1996 (1996-10-31), pages 201-203, XP004043363 ISSN: 0378-1119 the whole document --- -/--	1,3-8, 12,13, 16,17, 19,20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2000

Date of mailing of the international search report

26. 05. 00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No  
PCT/DK99/03432

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRIMES ET AL: "a 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport" PLANT CELL,US,AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, no. 4, 1 December 1992 (1992-12-01), pages 1561-1574, XP002079375 ISSN: 1040-4651 cited in the application the whole document	1,4-8, 12,13, 16,17, 19,20
P,X	WO 98 53086 A (CHAO WUN S ;GRIMES HOWARD D (US); UNIV WASHINGTON (US)) 26 November 1998 (1998-11-26)  page 12, line 28 -page 13, line 2 page 30, line 4 -page 31, line 5	1,3-8, 12,13, 16,17, 19,20
A	WO 92 18634 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 29 October 1992 (1992-10-29) the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 99/03432

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see supplemental sheet PCT/ISA 210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of box I.2

Claims nos. 2, 9-11, 14, 15, 18 (completely); 1, 3-8, 12, 13, 16, 17, 19, 20 (partially)

Claim 2 relates to an expression cassette that is characterized by the promoter having the sequence shown in Fig. 1. No search was carried out for the subject matter of claim 2 under the terms of Rule 13ter.1c PCT since no sequence listing corresponding to WIPO Standard ST 25 was filed (Rule 5.2 PCT); the sequence is not available either in computer-readable form nor as a paper copy. The applicant failed to remedy this deficiency within the term set in the Rule 13ter.1a communication.

Claims 9 and 10 relate to plasmids that are identified by their trivial names and by their method of production. No meaningful search can be carried out without knowing the sequence of the Sall promoter fragment.

Claims 11 and 18 relate to a method for introducing an expression cassette into a plant cell and to the plant cell obtained by this method. The steps for producing the expression cassette relate to clones that are identified by their trivial names. No meaningful search can be carried out in this case.

The same applies to claims 14 and 15 that relate to the use of plasmids that are identified by their trivial names.

Claims 1, 3-8, 12, 13, 16, 17, 19 and 20 relate to expression cassettes containing a promoter of the seed protein that is analogous to the sucrose binding protein (SBP) and their use. The term "seed protein that is analogous to SBP" is not clear. The search was carried out on the basis of sucrose binding proteins.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Publication No

PCT/DE 93/03432

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9853086 A	26-11-1998	AU 7500998 A EP 0991768 A ZA 9804322 A	11-12-1998 12-04-2000 19-01-1999
WO 9218634 A	29-10-1992	AU 669478 B AU 1468092 A CA 2106960 A EP 0580649 A JP 6506584 T US 5767363 A ZA 9202592 A	13-06-1996 17-11-1992 10-10-1992 02-02-1994 28-07-1994 16-06-1998 11-10-1993

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC / 99/03432

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSSTANDES  
 IPK 7 C12N15/82- C12N15/63 C12N5/10 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>HEIM U ET AL: "Cloning and characterization of full-length cDNA encoding sucrose phosphate synthase from faba bean"            GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING,            Bd. 178, Nr. 1,            31. Oktober 1996 (1996-10-31), Seiten 201-203, XP004043363            ISSN: 0378-1119            das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1,3-8,            12,13,            16,17,            19,20</p>

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Mai 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26. 05. 00

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GRIMES ET AL: "a 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport" PLANT CELL,US,AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, Nr. 4, 1. Dezember 1992 (1992-12-01), Seiten 1561-1574, XP002079375 ISSN: 1040-4651 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,4-8, 12,13, 16,17, 19,20
P,X	WO 98 53086 A (CHAO WUN S ;GRIMES HOWARD D (US); UNIV WASHINGTON (US)) 26. November 1998 (1998-11-26)  Seite 12, Zeile 28 -Seite 13, Zeile 2 Seite 30, Zeile 4 -Seite 31, Zeile 5	1,3-8, 12,13, 16,17, 19,20
A	WO 92 18634 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 29. Oktober 1992 (1992-10-29) das ganze Dokument	

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
**siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld 1.2

Ansprüche Nr.: 2, 9-11, 14, 15, 18 (Komplett); 1, 3-8, 12, 13, 16, 17, 19, 20 (Teilweise)

Anspruch 2 betrifft eine Expressionskassette, gekennzeichnet durch den Promoter mit der Sequenz gemäss Abb. 1. Der Gegenstand von Anspruch 2 wurde, in Übereinstimmung mit Regel 13ter.1c PCT, nicht recherchiert, da kein Sequenzprotokoll eingereicht, welches dem WIPO Standard ST 25 entsprechen würde (Regel 5.2 PCT); die Sequenz ist weder in einer Computerlesbaren Form noch als Papierkopie verfügbar. Der Anmelder hat diesen Mangel nicht innerhalb der in der Aufforderung gemäss Regel 13ter.1a festgesetzten Frist behoben.

Ansprüche 9 und 10 beziehen sich auf Plasmide, welche durch Trivialnamen sowie durch ein Herstellungsverfahren beschrieben werden. Ohne Kenntnis der Sequenz des SalI Promoterfragments kann keine sinnvolle Recherche durchgeführt werden.

Die Ansprüche 11 und 18 betreffen ein Verfahren zur Einführung einer Expressionskassette in eine Pflanzenzelle sowie die dadurch erhaltene Pflanzenzelle. Die Schritte zur Herstellung der Expressionskassette beziehen sich auf Klone, welche mit Trivialnamen identifiziert sind. Eine sinnvolle Recherche kann in diesem Fall nicht durchgeführt werden.

Analoges gilt für die Ansprüche 14 und 15, welche die Verwendung von durch Trivialnamen identifizierte Plasmide betreffen.

Die Ansprüche 1, 3-8, 12, 13, 16, 17, 19, und 20 beziehen sich auf Expressionskassetten enthaltend einen Promoter des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins und deren Verwendung. Der Begriff "SBP-ähnliches Samenprotein" ist unklar. Die Recherche wurde durchgeführt auf Basis von Saccharosebindeproteinen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC 1/199/03432

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9853086 A	26-11-1998	AU 7500998 A	11-12-1998
		EP 0991768 A	12-04-2000
		ZA 9804322 A	19-01-1999
-----			
WO 9218634 A	29-10-1992	AU 669478 B	13-06-1996
		AU 1468092 A	17-11-1992
		CA 2106960 A	10-10-1992
		EP 0580649 A	02-02-1994
		JP 6506584 T	28-07-1994
		US 5767363 A	16-06-1998
		ZA 9202592 A	11-10-1993
-----			

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Mai 2000 (11.05.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 00/26388 A3

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82,  
15/63, 5/10, A01H 5/00

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10,  
D-13125 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/03432

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
27. Oktober 1999 (27.10.1999)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasis-  
ches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:  
198 52 195.2 4. November 1998 (04.11.1998) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US*): INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK  
UND KULTURPFLANZENFOR- SCHUNG [DE/DE];  
Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).

Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): HEIM, Ute [DE/DE];  
Wasserstrasse 1, D-06466 Gatersleben (DE). WEBER,  
Hans [DE/DE]; Heinrichstrasse 11, D-06484 Quedlinburg  
(DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 3. August 2000

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten  
Fassung: 26. Juli 2001

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL EXPRESSION CASSETTE FOR EXPRESSING GENES IN PLANT SEED

(54) Bezeichnung: NEUE EXPRESSIONSKASSETTE ZUR EXPRESSION VON BELIEBIGEN GENEN IN PFLANZENSA-  
MEN

(57) Abstract: The invention relates to an expression cassette for expressing genes in plant seed and to the plasmids containing said expression cassette. The invention includes the production of transgenic plant cells containing said expression cassette and the use of the plasmids in said expression cassette for producing transgenic plants. The invention can be applied in the field of biotechnology, pharmaceuticals and plant production. The aim of the invention is to provide a means for the seed-specific expression in transgenic plants in such a manner that it is suitable for the production of the desired substances. Another aim of the invention is to construct an expression cassette which allows stable expression of genes of substances to be produced in plant seed at a high expression rate. The inventive expression cassette comprises the following essential components: the promoter of the gene of the seed protein which is analogous to the sucrose binding protein (SBP), optionally the DNA sequence of a signal peptide, preferably that of the SBP signal peptide, a gene to be expressed, 3' termination sequences.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen und die die Expressionskassette enthaltenden Plasmide. Die Erfindung schliesst die Herstellung transgener Pflanzenzellen, die diese Expressionskassette enthalten, sowie die Verwendung der Plasmide in dieser Expressionskassette zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit ein. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Pharmazie und die Pflanzenproduktion. Die Erfindung hat das Ziel, die samenspezifische Expression in transgenen Pflanzen auf eine für eine Stoffproduktion geeignete Basis zu stellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, eine Expressionskassette zu konstruieren, mit der eine stabile Expression mit hoher Expressionsrate von Genen der herzustellenden Stoffe in Pflanzensamen erreicht werden kann. Die erfindungsgemässe Expressionskassette enthält folgende wesentlichen Bestandteile: den Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins; ggf. die DNA-Sequenz eines Signalpeptids, bevorzugt des SBP-Signalpeptids; ein zu exprimierendes Gen; 3'-Terminationssequenzen.



WO 00/26388 A3



**(15) Informationen zur Berichtigung:**

siehe PCT Gazette Nr. 30/2001 vom 26. Juli 2001, Section  
II

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

## Neue Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen

### Beschreibung

5

10

15

20

25

30

35

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen und die die Expressionskassette enthaltenden Plasmide. Die Erfindung schließt die Herstellung transgener Pflanzenzellen, die diese Expressionskassette enthalten, sowie die Verwendung der Plasmide in dieser Expressionskassette zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit ein. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Pharmazie und die Pflanzenproduktion.

Seit langem gibt es Methoden, die es ermöglichen, relevante Gene in das Genom höherer Pflanzen einzuschleusen. Ziel dieser Arbeiten ist die Herstellung von Pflanzen mit neuen Eigenschaften, zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktion, der Optimierung der Lebensmittelherstellung und der Produktion bestimmter Pharmazeutika und anderer interessanter Inhaltsstoffe. Eine Voraussetzung für die Expression der übertragenen Gene ist dabei, daß sie über pflanzenspezifische Promotorsequenzen verfügen. So werden dazu bereits sogenannte konstitutive Promotoren wie der Promotor des Nopalinsynthase - Gens /1/ , der TR - Doppelpromotor /2/ oder der Promotor des 35S - Transkriptes des Blumenkohl - Mosaikvirus /3/ verwendet. Ein Nachteil dieser Promotoren ist es, daß sie in fast allen Geweben der manipulierten Pflanzen aktiv sind. Dadurch ist eine kontrollierte und gezielte Expression der Fremdgene in den Pflanzen nicht möglich. Es ist besser, Promotoren zu benutzen, die gewebespezifisch und entwicklungsabhängig funktionieren. So wurden Gene mit den dazu gehörigen Promotoren isoliert, die nur in Antheren, Ovarien, Blüten, Blättern, Laubblättern, Stengeln, Wurzeln oder Samen aktiv sind /4/. Sie unterscheiden sich aber sehr in der Stärke und

Spezifität der Expression und sind nur begrenzt einsetzbar. Für die Nutzung der Samen als Ernährungsquelle und zur Produktion von Inhaltsstoffen sind vor allem die samenspezifischen Promotoren von großem Interesse. Durch die langjährige Erforschung der Gene der Samenspeicherproteine stehen schon einige mehr oder weniger spezifische und in der Stärke unterschiedliche Promotoren, wie beispielsweise des Phaseolins /5/ oder des Legumins und USP /6/ zur Verfügung. Da diese Speicherproteine von Genfamilien synthetisiert werden, stehen Fusionen solcher Promotoren mit Fremdgenen in Konkurrenz zu den endogenen zahlreichen Genen der entsprechenden Genfamilie. Deshalb ist es günstiger, Promotoren von unikal, stark und spezifisch exprimierenden Genen zu benutzen. Für Ko- und Mehrfachtransformationen ist die Verwendung verschiedener regulatorischer Sequenzen angebracht, um die zeitliche Entwicklung des Samens besser auszunutzen, parallel gleiche oder verschiedene Genprodukte zu synthetisieren und um Kosuppression zu vermeiden.

Obwohl also bereits mehrere Expressionskassetten zur Expression beliebiger Gene in Pflanzensamen bekannt sind, waren die erreichten Expressionsraten in Pflanzensamen bisher noch nicht optimal, um darauf eine pflanzenbiotechnologische Produktion der gewünschten Stoffe zu begründen.

Die Erfindung hat daher das Ziel, die samenspezifische Expression in transgenen Pflanzen auf eine für eine Stoffproduktion geeignete Basis zu stellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, eine Expressionskassette zu konstruieren, mit der eine stabile Expression mit hoher Expressionsrate von Genen der herzustellenden Stoffe in Pflanzensamen erreicht werden kann.

Die Zielstellung der Erfindung wird mit der in Anspruch 1 beschriebenen Expressionskassette erreicht, die Unteransprüche 2-7 sind Vorzugsvarianten.



Die erfindungsgemäße Expressionskassette enthält folgende wesentlichen Bestandteile:

- o den Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins
- 5 o ggf. die DNA-Sequenz eines Signalpeptids, bevorzugt des SBP-Signalpeptids
- o ein zu exprimierendes Gen
- o 3'-Terminationssequenzen

Die Erfindung bezieht sich vor allem auf eine unikal im Genom  
10 vorkommende regulatorische DNA - Sequenz, die eine starke Expression eines beliebigen heterologen Gens im wesentlichen in den Keimblättern und im Endosperm von Samen entwicklungsabhängig vermittelt.

Der wichtigste Bestandteil der Kassette ist der SBP-Promotor,  
15 dessen Sequenz in der Abb. 1 dargestellt ist. Dieser Promotor hat gegenüber analogen Promotoren auf diesem Gebiet den Vorfeil großer Stärke und Samenspezifität. Seine Nutzung für die Expression von Fremdgenen auch ohne die DNA-Sequenz eines Signalpeptids gehört ebenfalls zum Umfang der Erfindung.

20 Die Expressionskassette enthält neben den transkriptionell regulatorischen Sequenzen ggf. auch ein Signalpeptid, welches den Transport des gewünschten Genproduktes in die Proteinkörper ermöglicht und so einen Abbau der Genprodukte  
25 weitgehend verhindert. Die wahlweise Nutzung des authentischen Signalpeptids ermöglicht den Transport des synthetisierten Fremdproteins zu und die Lagerung in den Proteinbodies.

30 Die zu exprimierenden Gene können entweder als Transkriptions- oder als Translationsfusionen integriert sein, sie können weitgehend variiert werden, beispielsweise können Gene für die Produktion von Enzymen (z.B. Amylase, Xylanase), pharmazeutischer Produkte oder für die  
35 Überexpression von Proteinen mit einem hohen Anteil essentieller Aminosäuren (z.B. methioninreiches 2S Globulin der Brasilnuß) oder anderer die Eigenschaften der Samen

beeinflussender Proteine eingesetzt werden. Weitere Möglichkeiten liegen in der Reduzierung oder im Ausschalten von Genprodukten durch die Integration von Genen in antisense Orientierung. Durch den Einbau regulatorischer Gene unter Kontrolle dieses samenspezifischen Promotors können auch Stoffwechselprozesse im Samen beeinflusst werden. Die Kassette kann ebenfalls benutzt werden, um das dem Promotor eigene SBP Gen aus der Ackerbohne in anderen Spezies zu exprimieren. Die Nutzung anderer Terminatoren, so zum Beispiel die Terminationsequenz des zu exprimierenden Gens, ist eine weitere Möglichkeit, um die Kassette optimal einzusetzen. Als konkretes Beispiel wurde das Gen der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) genutzt, um die Spezifität des Promotors zu zeigen (Abb. 2b,c).

Die Nukleotidsequenz der Expressionskassette enthält transkriptional regulatorische Bereiche, die eine starke spezifische Expression eines beliebigen Gens in den Samen von Pflanzen gewährleistet. Der Northern (Abb. 2a) zeigt die hohe samenspezifische Expression in den verschiedenen Geweben von *Vicia faba*. Die GUS-Daten in den Abb. 2b und 2c zeigen zum einen in den Schnitten durch reifen Tabaksamen die Verteilung der  $\beta$ -Glucuronidase und zum anderen die entwicklungsabhängige Akkumulation der  $\beta$ -Glucuronidase in den transgenen Tabaksamen.

Unter Schutz gestellt werden auch die Plasmide, welche die Expressionskassette enthalten, bevorzugt die Plasmide pSBPROCS und pPTVSBPRGUS.

Zum Umfang der Erfindung gehört auch die Verwendung der Expressionskassette gemäß Ansprüchen 12-16, die durch Transformation in Bakterienstämme und anschließendem Transfer der entstandenen rekombinanten Klone in vorzugsweise dicotyle Pflanzen erfolgt. Die das gewünschte Genprodukt im Samen exprimierenden Pflanzen werden selektiert und als genetisch stabile Linien gezüchtet. Nach der Ernte werden dann die

gewünschten Genprodukte aus den transgenen Samen in an sich bekannter Weise extrahiert.

5 Diese Erfindung ist auch interessant für Anwendungen, wo das gewünschte Genprodukt unter der Kontrolle verschiedener Promotoren exprimiert wird, um die Expressionsraten in der Summe zu erhöhen, um den Entwicklungszeitraum der Samen besser zu nutzen und um Effekte durch Kosuppression zu vermeiden. Für Ko- und Mehrfachtransformationen mit dem  
10 Ziel, verschiedene Genprodukte zu exprimieren, ist diese Expressionskassette ebenfalls geeignet. Für diese Strategien benötigt man eine Vielzahl neuartiger Expressionskassetten, um die richtigen auswählen zu können.

15 Das gesamte Verfahren zur Veränderung einer Pflanzenzelle wird an einem Beispiel (pSBPOCS) dargestellt.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

20

### Methoden

#### 1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung wurden die Vektoren pUC18 /7/, pBK-CMV  
25 (Stratagene) und pOCS1 (Plant Genetic Systems, Gent, Belgien) und für die Pflanzentransformation die Vektoren BIN19 /8/, sowie nach Deletion des GUS Gens pGPTV-BAR /9/, verwendet.

#### 2. Bakterienstämme

30 Für die Transformation in E. coli wurde der Stamm DH5α /10/ verwendet. Durch Konjugation wurden die Binärplasmide in den Agrobakterienstamm EHA105 /11/ eingeführt.

#### 3. Pflanzentransformation

35 Die Transformation von Nicotiana tabaccum erfolgte durch die Blattscheibchenmethode /12/ und die Transformation von Vicia

narbonensis mit Hilfe der von Pickardt 1991 beschriebenen Methode /13/ über Agrobakterien vermittelten Gentransfer.

#### 4. Analyse genomischer DNA aus transgenen Pflanzen

- 5 Die genomische DNA der transgenen Tabak und V. narbonensis Pflanzen wurde mit Hilfe des DNA - Isolierungskit der Firma Macherey & Nagel isoliert. In einem ersten Schritt wurden die transgenen Linien über PCR mit genspezifischen Primern identifiziert. Die Integration der Fremd-DNA wurde mittels
- 10 "Southernblot" - Analysen von 20µg DNA nach geeigneter Restriktionsspaltung untersucht.

#### 5. β-Glucuronidase - Aktivitätstest (GUS - Assay)

- Das Reporter-gen β-Glucuronidase ist ein bakterielles Enzym,
- 15 das sowohl quantitativen /14/ als auch histochemischen Aktivitätsbestimmungen zugänglich ist. Gewebeproben wurden in 1mM X-Gluc, 50mM Na-Phosphat (pH 7,0) und 0,1% Tween 20 über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Schnitte wurden die Gewebe fixiert, in Paraffin eingebettet und am Mikrotom auf
- 20 15 - 30 µm Schnittdicke geschnitten.

#### Ausführungsbeispiele

- Die Erfindung, die die Herstellung einer neuen
- 25 samenspezifischen Expressionskassette enthält sowie die sich daraus ableitenden Plasmide und transgenen Pflanzen, wird nachstehend - zum Teil an Hand von den Abbildungen- an einem Ausführungsbeispiel erläutert.

- 30 1.) Klonierung und Strukturanalyse eines SBP - Samenprotein - Gens aus Vicia faba

- Von der Sequenz eines cDNA Klons, der für das Saccharosebindeprotein aus der Sojabohne kodiert /15/, wurden Primer (5'-GAAGACCCTGAGCTCGTAACTTGCAA-ACAC- 3' und 5'-
- 35 AGTACTCATAGATCTCTGGGTGATGTTGGT-3') abgeleitet. Mittels RT - PCR an mRNA, isoliert aus unreifen Kotyledonen von V. faba, wurde dann die genspezifische Sonde amplifiziert, kloniert

und sequenziert. Das PCR - Produkt wurde als dem Saccharosebindeprotein homologes Genfragment identifiziert und diente als Sonde für die Isolierung der vollständigen cDNA aus einer Kodyledonon spezifischen  $\lambda$  Zap Express cDNA Bank aus *V. faba* L. var. minor. Einer der isolierten Klone (VfSBP20), der auf Nukleotidebene eine Homologie von 68% hat, kodiert für das vollständige SBP homologe Gen aus der Ackerbohne. Es unterscheidet sich aber sowohl in der Expression (Abb.2a) als auch in der Funktion (keine Saccharosebindung) von dem aus der Sojabohne isoliertem Gen.

2) Isolierung der regulatorischen Sequenzen mittels PCR  
Die regulatorischen Sequenzen wurden mit Hilfe des "Universal GenomeWalker™ Kit" der Firma CLONTECH und den genspezifischen Primern PSBP1, Position 159 (5'-AATCCTCA-CACTTCTCCATGCATATCCGTTTGTCC-3'), PSBP2, Position 118 (5'-GCCCTGCAGAT-CGCATTTGTCTTTGCA-3') und PSBP3, Position 85 (5'-CTGGGTCCTTTTCTTTTCTGG-C-3') isoliert. Nach vorheriger Spaltung der genomischen DNA von *V.faba* mit ScaI (a) bzw. StuI (b) und Ligation der Adaptoren wurde entsprechend der Beschreibung des Kits eine Zweischritt - PCR nach folgenden Parametern durchgeführt: 7 Zyklen a' 94°C, 2s, 72°C, 3 min und 32 Zyklen a' 94°C, 2s, 67°C, 3 min und 4min 67°C. Die PCR - Ansätze wurden 1:50 verdünnt und jeweils 1µl in einer zweiten PCR (5 Zyklen a' 94°C, 2s, 72°C, 3 min und 20 Zyklen a' 94°C, 2s, 67°C und 4min bei 67°C amplifiziert. Im Agarosegel konnten Banden von 1,7kb aus (a) und 1,9kb aus (b) über einen Southernblot verifiziert werden. Diese Banden wurden dann in den pUC18 kloniert und sequenziert. Die Klone SBPR7 und SBPR15 konnten dann durch Sequenzvergleich als die zum Gen VfSBP20 zugehörigen Promotoren identifiziert werden. Sie stellen allelische Varianten des Gens VfSBP20 dar, wobei beide Klone 100% Sequenzidentität im entsprechenden Bereich zum Klon VfSBP20 aufweisen. 5'seitig vom ATG des SBP Gens sind mit dem Klon SBPR7 1539bp und mit dem Klon SBPR15 1750bp isoliert worden. Sie unterscheiden sich durch 23 Basenpaarsubstitutionen und zwei Insertionen. Die

Restriktionskarte der Klone pSBPR7 und pSBPR15 sind in Abb. 3, die Sequenz des Klons pSBPR15 ist in Abb. 1 wiedergegeben.

5 3a) Nachweis der samenspezifischen Expression in Tabak  
Mit Hilfe des Reportergens der  $\beta$ -Glucuronidase sollte die  
samenspezifische Expression der isolierten regulatorischen  
Sequenzen SBPR7 und SBPR15 überprüft werden. Dazu wurde das  
Binärplasmid pBI101 /14/, welches das promotorlose  
10 Glucuronidase Gen hinter einem Polylinker enthält, mit SmaI  
geschnitten und dephosphoryliert. Aus den Plasmiden pSBPR7  
bzw. pSBPR15 wurden mittels einer SalI/NcoI Spaltung die  
Promotoren isoliert und die Enden geglättet. Die Fragmente  
wurden dann in den SmaI - Ort des Binärplasmides pBI101 vor  
15 das Reportergen kloniert, wobei die Plasmide pBISBPR7GUS und  
pBISBPR15GUS entstanden sind. Diese Plasmide wurden dann in  
den Agrobakterienstamm EHA105 transferiert und die chimären  
SBP-Promotor/Glucuronidase Gen enthaltenen Agrobakterien für  
die Transformation von Tabak eingesetzt. Die Ergebnisse sind  
20 in Figur 2b und 2c abgebildet. Die Analyse der transgenen  
Tabaksamen zeigt eine starke Blaufärbung und damit eine  
starke Aktivität der Glucuronidase im Endosperm und in den  
Keimblättern der Tabaksamen auch entsprechend der  
Samenentwicklung. In anderen Geweben konnte keine  
25 Glucuronidaseaktivität nachgewiesen werden. Auch  
unterscheiden sich die beiden leicht verschiedenen  
Nukleotidsequenzen SBPR7 und SBPR15 nicht in ihrem  
Expressionsverhalten. Diese Daten zeigen, daß die isolierten  
regulatorischen Sequenzen, die mit dem  $\beta$ -Glucuronidase Gen  
30 fusioniert wurden, eine starke und streng samenspezifische  
Expression im Tabak vermitteln.

3b) Nachweis der samenspezifischen Expression in der Erbse  
Um zu zeigen, daß auch in den Leguminosen mit einer  
35 samenspezifischen Expression zu rechnen ist, wurde das  
SalI/NcoI Fragment des Plasmids pSBPR15 in das SalI/NcoI  
geschnittene Plasmid pGUS1 (Plant Genetic Systems, Gent)

kloniert. Aus dem resultierenden Plasmid pSBPGUS wurde mit SalI/SmaI die Fusion des SBPR15 Promoters/GUS/ocs-Terminator ausgeschnitten, geglättet und in das Binärplasmid pGPTV-Bar, EcoRI/SmaI geschnitten, ligiert (Abb.4) . pGPTV-Bar /9/ ist ein Phosphinithricin-resistenz vermittelndes Binärplasmid, welches erfolgreich für die Transformation von Erbsen eingesetzt wird. Dieses Plasmid wurde pPTVSBPRGUS (Abb.4) genannt. Die Embryonen der mit diesem Plasmid erzeugten transgenen Erbsenlinien zeigen eine starke Blaufärbung nach histochemischer Analyse.

3c) Nachweis der transienten Expression in Embryonen von *Vicia faba*, *Vicia narbonensis*, *Pisum sativum* und *Brassica napus*

Mit dem Plasmid pSBPGUS wurden isolierte Embryonen von *Vicia faba*, *Vicia narbonensis*, *Pisum sativum* und *Brassica napus* mittels dem Biolistics PDS-1000/He Particle Delivery System unter folgenden Bedingungen beschossen. Der Coating-Ansatz bestand aus 50µl Gold (Hereaus, 0,6-3µm, 50mg/ml), 10µl Qiagen gereinigte Plasmid-DNA (1µg/µl), 50µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> und 10µl 0,1M Spermidine. Bei 1800 Psi und einem Vakuum von 27 inch Hg wurden dann die auf einer Agarplatte liegenden Embryonen beschossen, die anschließend in MS-2% Sucrose Flüssigmedium für 2 Tage kultiviert wurden. Dann erfolgte die Reaktion mit X-Gluc (1mM) in 50mM Na-Phosphat (pH 7,0) und 0,1% Tween 20 über Nacht bei 37°C. Im Gegensatz zur Negativkontrolle (promoterloses pGUS1) konnten viele blaue Punkte bei den obengenannten Embryonen registriert werden, die zeigen, daß der SBP-Promoter in den Samen funktioniert.

4.) Herstellung der Expressionskassette zur Überexpression von heterologen Genen in Samen

Um die regulatorischen Sequenzen für die Überexpression von Fremdgenen verfügbar zu machen, wurde das SalI Fragment des längeren Klons SBPR15 isoliert und geglättet und in den SmaI Ort des Plasmides pOCS1 (Plant Genetic Systems, Gent, Belgien) kloniert. Diese Kassette enthält somit die

Promotorregion, die vollständige 5' untranslatierte Region, das vollständige Signalpeptid, die ersten fünf Triplets des reifen Proteins (Abb. 1) und den 3' untranslatierten Bereich mit den Polyadenylierungssignalen des Octopin Synthase Gens (Fig.5). Für Transkriptionsfusionen mit Fremdgenen kann der NcoI-Ort, für Translationsfusionen der BamHI -Ort genutzt werden. Nach erfolgter Insertion des Fremdgens wird die den Promoter, regulatorische Sequenzen, das Fremdgen und die 3'-Terminationssequenzen enthaltene Sequenz mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in einen Binärvektor mit der für die Pflanzentransformation geeigneten Herbizidresistenz kloniert.

Als Beispiel dafür wurde das BamHI-Fragment des Gens der XylanaseZ von Clostridium thermocellum in den BamHI-Ort des Plasmids pSBPOCS als Translationsfusion kloniert. Aus dem resultierenden Plasmid pSBPRXYNZ (Abb. 6) wurde das geglättete Asp718/SphI Fragment mit dem mit den Enzymen EcoRI/SmaI geschnitten und geglätteten Binärvektor pGPTV-Bar ligiert. Nach Transformation in den Agrobakterienstamm EHA105 wurde N. Tabacum transformiert. In den reifen transgenen Samen konnte im Western Blot die starke Expression der Xylanase Z gezeigt werden (Abb. 7).

25

#### Literatur:

1. Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Nature, 303, No. 5914, 209-213.
2. Velten, J., Velten, L., Hani, R. and Schull, J. (1984) EMBO J. 3, 2723-2730.
3. Koziel, M.G., Adams, T.L., Hazlet, M.A., Damm, D., Miller, J., Dahlbeck, D., Jayne, S. and Staskawicz, B.J. (1984) Journ. of Molec. and Appl. Genet. 2, 549-562.
4. Goldberg, R.B. (1986) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B314, 343-353.
5. Hall, T. C. et al (1996) US Patent 5,504,200
6. Conrad, U. et al. (19-- ) deutsches Patent DE 196 04 588.6



7. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Gene, 33, 103-119.
8. Bevan, M. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 8711-8720.
9. Becker, D., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. (1992)  
5 Plant Mol. Biol. 20, 1195-1197.
10. Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580.
11. Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A.  
(1993) Transgenic. Res. 2, 208-218.
12. Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Bassüner, R., Van  
10 Montagu, M., Inze, D. and Wobus, U. (1991) Mol Gen. Genet,  
225, 459-467.
13. Pickardt, T., Meixner, M., Schade, V. and Schieder, O.  
(1991) Plant Cell Report, 9, 535-538.
14. Jefferson, R.A. (1987) Plant Molec. Biol. Rep. 5, 387-  
15 405.
15. Grimes, H.D., Overvoorde, P.J., Ripp, K., Franceschi, V.R.  
and Hitz, W.D. (1992) The Plant Cell, 4, 1561-1574.

## Patentansprüche

1. Neue Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen bestehend aus
  - 5 o dem Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins
  - o ggf. der DNA-Sequenz eines Signalpeptids, bevorzugt des SBP-Signalpeptids
  - o einem zu exprimierenden Gen
  - 10 o 3'-Terminationssequenzen
2. Expressionkassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie den SBPR-Promotor mit der Sequenz entsprechend Abb.1  
15 ohne DNA-Sequenz eines Signalpeptids enthält.
3. Expressionkassette nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der mit einer transkriptional regulatorischen Sequenz für eine starke samenspezifische  
20 Genexpression versehenen DNA - Region eine weitere DNA Sequenz nachgeschaltet ist, die die Information für die Bildung und mengenmäßige Verteilung endogener Produkte oder die Expression heterologer Produkte in Kulturpflanzen enthält.
- 25 4. Expressionkassette nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß beliebige ~Fremdgene entweder als Transkriptions- oder als Translationsfusionen integriert sind.
5. Expressionkassette nach Anspruch 1 bis 4, dadurch  
30 gekennzeichnet, daß das Signalpeptid des SBP - Samenprotein - Gens als Signalpeptid verwendet wird.

6. Expressionskassette nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als das zu exprimierende Gen das Gen des Saccharosebindeprotein verwandte Gen eingesetzt wird.
- 5 7. Expressionskassette nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß sie auch für Ko- und Mehrfachtransformationen eingesetzt wird.
8. Plasmide enthaltend eine Expressionskassette gemäß den  
10 Ansprüchen 1-5.
9. Plasmid pSBPROCS, bestehend (enthaltend?) aus einer etwa 5,3kb großen DNA Sequenz, in der ein etwa 1,9kb großes SalI - Promoterfragment  
15 des regulatorischen Starterbereichs inklusive des Signalpeptides und 5 Tripletts des SBP homologen Gens aus Vicia-faba, Restriktionsorte zum Einklonieren von Fremdgenen und der Transkriptionsterminator des Octopinsynthasegens enthalten sind.
- 20 10. Plasmid pPTVSBPRGUS, bestehend (enthaltend?) aus einer ca. 14,9kb großen DNA-Sequenz, in der ein etwa 1kb großes Phosphinothricin - Resistenzgen, ein etwa 1,8kb großes SalI/NcoI-Promoterfragment des regulatorischen Starterbereiches des SBP homologen Gens aus Vicia faba, die etwa 2kb große  
25 kodierende Region der  $\beta$  - Glucuronidase und der Transcriptionsterminator des Octopinsynthasegens enthalten sind.
11. Verfahren zur Einführung einer Expressionskassette mit einer DNA-Sequenz zur starken samenspezifischen Genexpression in eine  
30 Pflanzenzelle, das folgende Schritte beinhaltet:
- a) Isolation des Klons VfSBP20, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen, welches für das in Pflanzensamen vorkommende SBP - Samenprotein kodiert, aus einer cDNA Bank von Kotyledonen von Vicia faba selektiert wird,

- b) Isolation des Klons pSBPR15, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltende DNA Sequenz die regulatorische Starterregion des SBP - Samenprotein - Gens aus *Vicia faba* bzw. eine mit der DNA-Sequenz des SBPR15 hybridisierende Sequenz aus einer verwandten Leguminose enthält,
- c) Herstellung des Plasmids pSBPOCS unter Verwendung des 1,9kb großen SalI Fragments des Plasmid pSBPR15.
- d) Integration von Fremdgenen in die Expressionskassette pSBPOCS,
- e) Klonierung der Expressionskassette, die eine DNA-Sequenz enthält zur Überexpression von Fremdgenen in Pflanzensamen, in Binärvektoren
- f) Transfer der Expressionskassette, die ein Fremdgen unter der Kontrolle des SBPR Promoters enthält, in eine Pflanzenzelle.

12. Verwendung einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 zur Expression homologer und heterologer Gene in Samen transformierter Pflanzen.

13. Verwendung einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 zur Expression von Genen, die die Lagereigenschaften oder die Keimfähigkeit von Samen verändern.

14. Verwendung der Plasmide pBISBPR7, pBISBPR15, pSBPGUS, pPTVSBPRGUS und pSBPOCS oder Derivate davon zur Transformation von Kulturpflanzen.

15. Verwendung der Plasmide pBISBPR7, pBISBPR15, pSBPGUS, pPTVSBPRGUS und pSBPOCS oder Derivate davon zur Regulation endogener Prozesse oder zur Herstellung heterogener Produkte in Kulturpflanzen.

16. Verwendung einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß die transformierten Pflanzen, die im Samen veränderte oder neue Genprodukte exprimieren, selektiert, genetisch stabile Linien gezüchtet und die  
5 Genprodukte aus den Samen der transgenen Pflanzen extrahiert werden.

17. Pflanzenzelle, enthaltend ein Plasmid gemäß Anspruch 8 - 10.

10 18. Pflanzenzelle, hergestellt nach dem Verfahren des Anspruchs 11.

19. Pflanze oder pflanzliche Gewebe, regeneriert aus einer Pflanzenzelle gemäß der Ansprüche 12 oder 13.

15

20. Pflanze gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Kulturpflanze ist.

Fig. 1

ATCCAACCTTCTGATCTTTGAATCTCTCTGTTCCAACATGTCTGAAGGAGTTCTAAGACTTTTCAGAAAGCTTGTAAACAT  
GCTTTGTAGACTTTCTTTGAATTACTCTTGCAAACTCTGATTGAACCTACGTGAAAACCTGCTCCAGAAAGTTCTAAACCAA  
TTCCGCTCTTGGGAAGGCCCAAAATTTATTGAGTACTTCAGTTTCATGGACGTGTCTCAAGATTTATAAATTTGAAAATCC  
CATCATTTTAAAGAGAAGTTCTGTTCCGCAATGTCTTAGATCTCATTGAAATCTACAACCTCTTGTCGAGAGTTCTTCC  
AGAAATCAACTTGCATCATGGTGAAAACTCGCCAGAGTTCTGAACCTGTCTAATTTCTTAACAGTTAGAAAAAATTTCTTA  
AGTGTTTAGAATTTTGACTTTTCCAAAGCAAACTTGACTTTTGACTTTCTTAATAAAACAACCTTCATATTCTAACACATGT  
CTTGATGAAAATGTGATTCTTGAAATTTGATGTCAAAAGTCAAAGTTTGACTTTTCAGTGTGCAATTGACCATTTT  
GCTCTTGTCCTAATTCCAAACCTAAATTTGATGATCAGTGTGCAAACTTGATGTCATGGAAAGATCTTATGAGAAAAATTC  
TTGAAGACTGAGAGGAAAAATTTGTAGTACACACAAAAATCCTGTTTTCATAGTCGGACTAGACACATTAACATAAA  
AACACCACTTCATTCGAAGAGTGATTGAAGAAGGAAATGTGCAGTTACCTTTCTGCAGTTCAAGAGCAACACATTACAGAC  
ACTTTTACTAAAAATACTACAAAGAGGAAGATTTAAACAACCTTAGAGAAAGTAATGGGAGTTAAAGAGCAACACATTAAAGGG  
GGAGTGTAAAAATTAATGTGTGTAACCACTACCTTTAGTAAGTATTATAAGAAAAATTGTAATCATCACATTATATAAT  
TATTGTCTTATTAAAAATATGATAAAGTTGTATCATTTAAGATTGAGAAAAACCAATAGTCTCTGCTTGTGATTTTGGAA  
TTATTGTTTTCTATGTTACTTTTCTCAAGCCTATATAAAAACTTTGTAAATGCTAAATTTGATGCTGGAAAAAAATGTGT  
AATGAAATCAATAGAAATATGGTATTTCAAAGTCCAAAATCCATCAATAGAAATTTAGTACAAAAACGTAACCTCAAAAAT  
ATTCCTTATTTTAAATTTTACACAATATAAAAAATATTCCTTATTTTAAATTTTACAATAATAATTTATCACCTGT  
CACCTTTAGAATACCACCAACAATATAATCTTAGATATTTTATTTCTTAATAATTTTGAGATCTCTCAATATATCTGAT  
ATTTATTTTATATTGTGTGTCATATTTCTTATGTTTGTAGAGTTAACCTTATATCTTGGTCAAACTAGTAATTTCAATATA  
TGAGTTTGTGAAGGACACATTGACATCTTGAACATTTGGTTTAAACCTTTGTTGGAATGTTAAAGGTAATAAAACATTCAG  
AATTATGACCATCTATTAAATATCTTCTTGTCTTTTAAAAAAGTGTGCATGAAAAATGCTCTATGGTAAGCTAGAGTGT  
CTTGCTGGCCTGTATATCAATTCCTATTTCCAGATGGTAGAAACTGCCACTACGAATAATTAGTCATAAGACACGTATG  
TTAACACACGTCCTTGCATGTTTGTGCCATATATTCCTGCTCTTTCTTTTCTTCCAGTATAAAAAACAATGAACATAAT  
TAATAGAGCGATCAAGCTGAACC

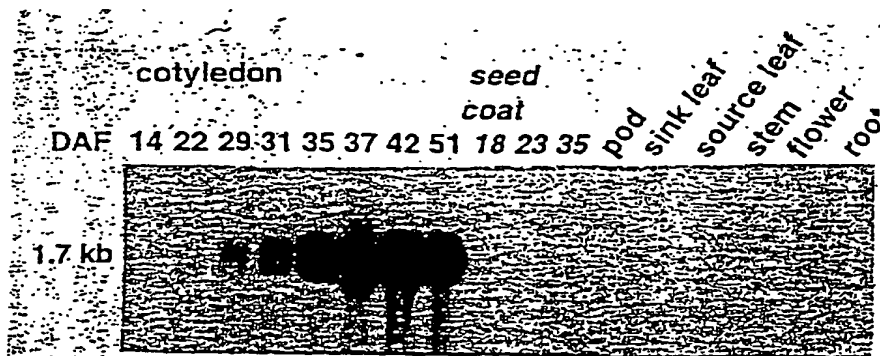
**NcoI**

# HindIII

ATG GCG ATT AAA ACA AAG CTT	TCC TTA ACC ATC TTT CTT TTC TTC CTC TTA GCT TTA CTA TGC
M A I K T K L	
TCA AAC TTA GCC ATA GCC AGA	AAA GAA AAG GAC GGG ATC CAT CTA GAG TCC TGC TTT AAT GAG
S N L A I A R	K E E D G I Q L E F C F N E
	SP

25

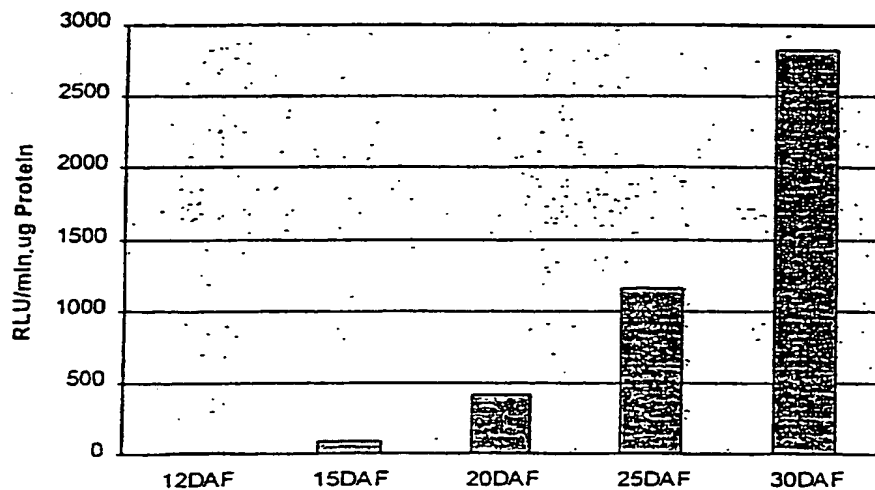
Fig. 2



2a) Northern V.faba RNA gegen VfSBP20 Sonde,



2b) Schnitt durch reife transgene (SBPRGUS) Tabaksamen

GUS Gehalt in transgenen pSBPRGUS Tabak Linien  
(n=15)

2c)

BERICHTIGES BLATT (REGEL 19)  
ISA/EP

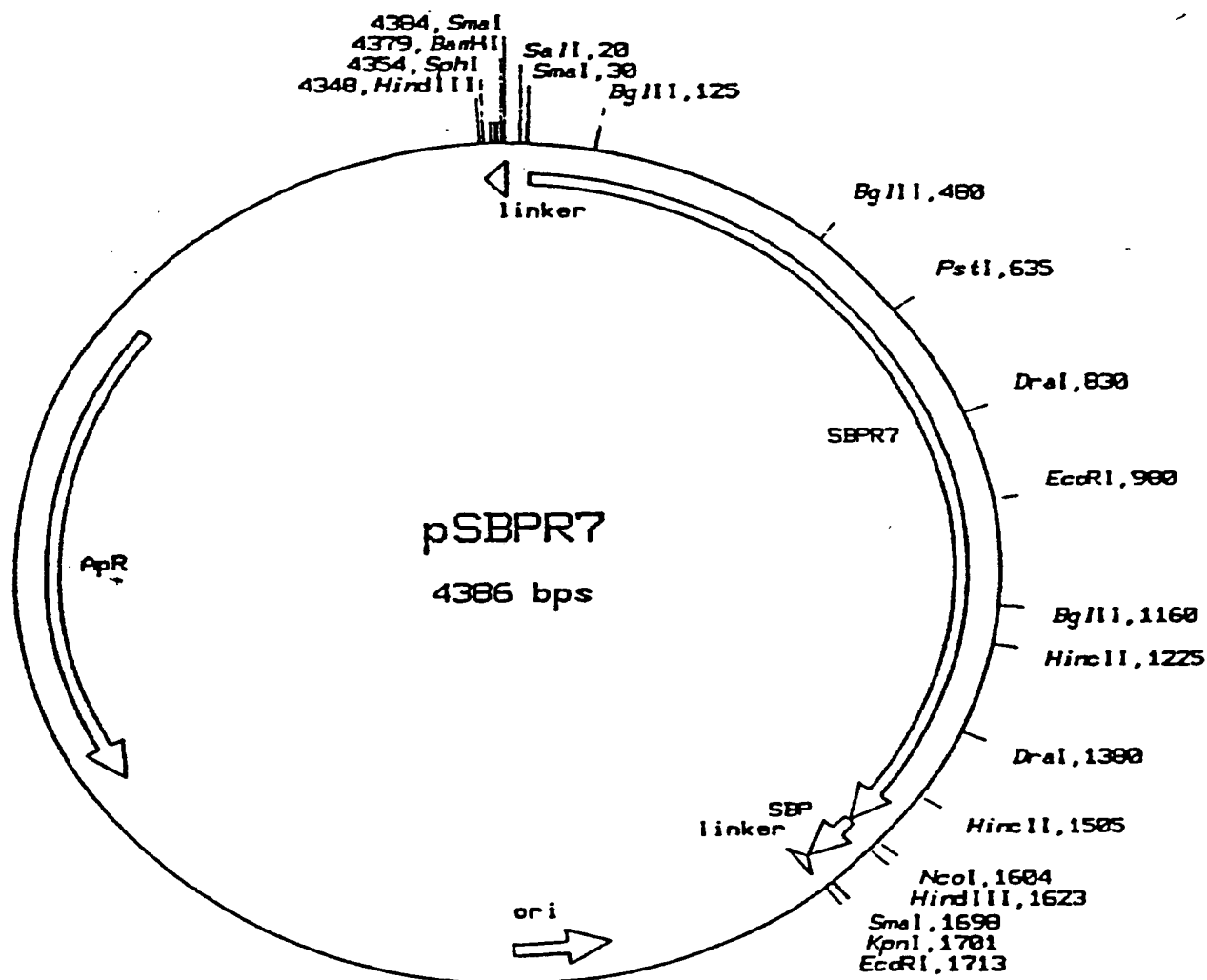


Fig. 3 (n)



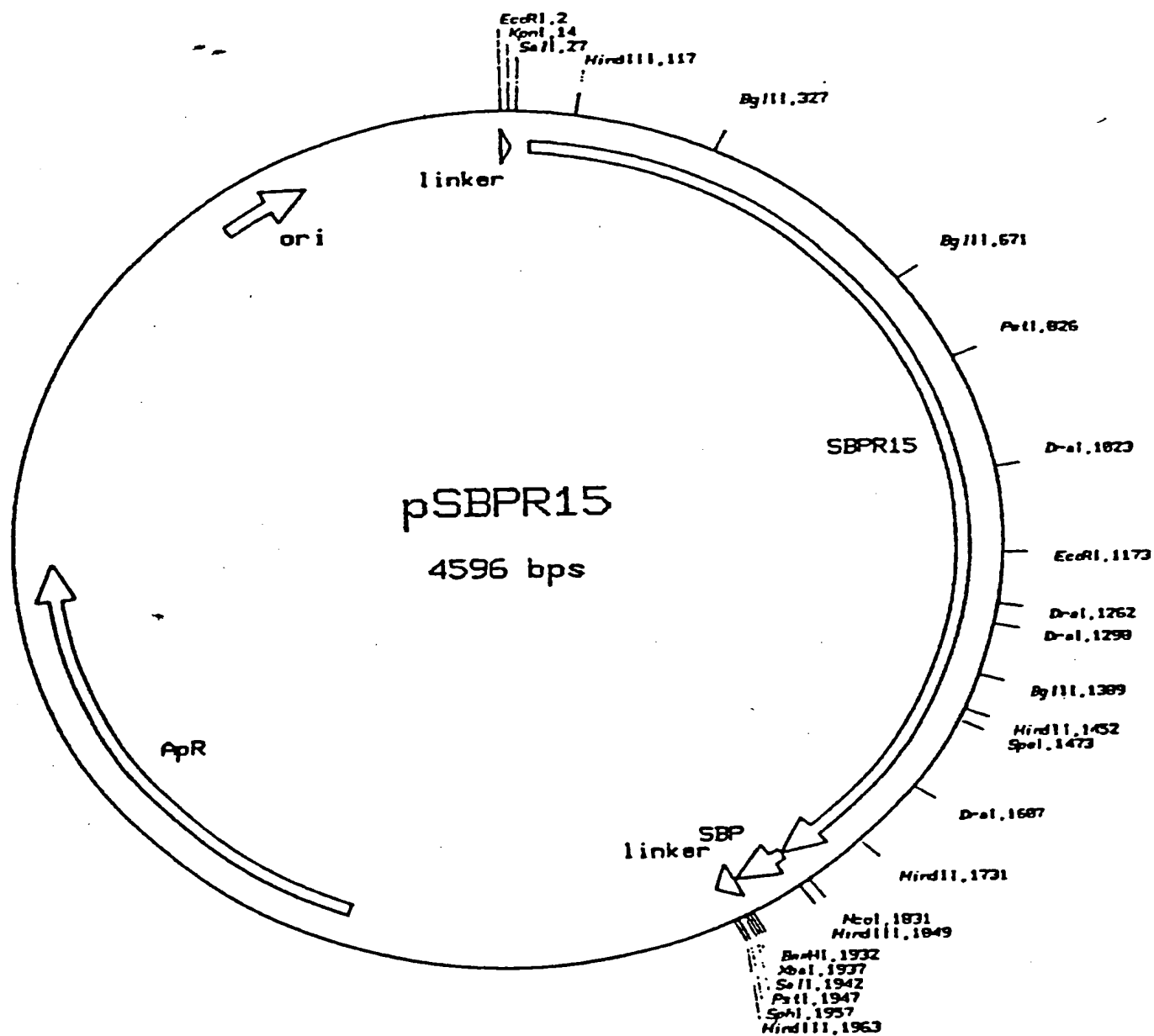


Fig. 3 (2)

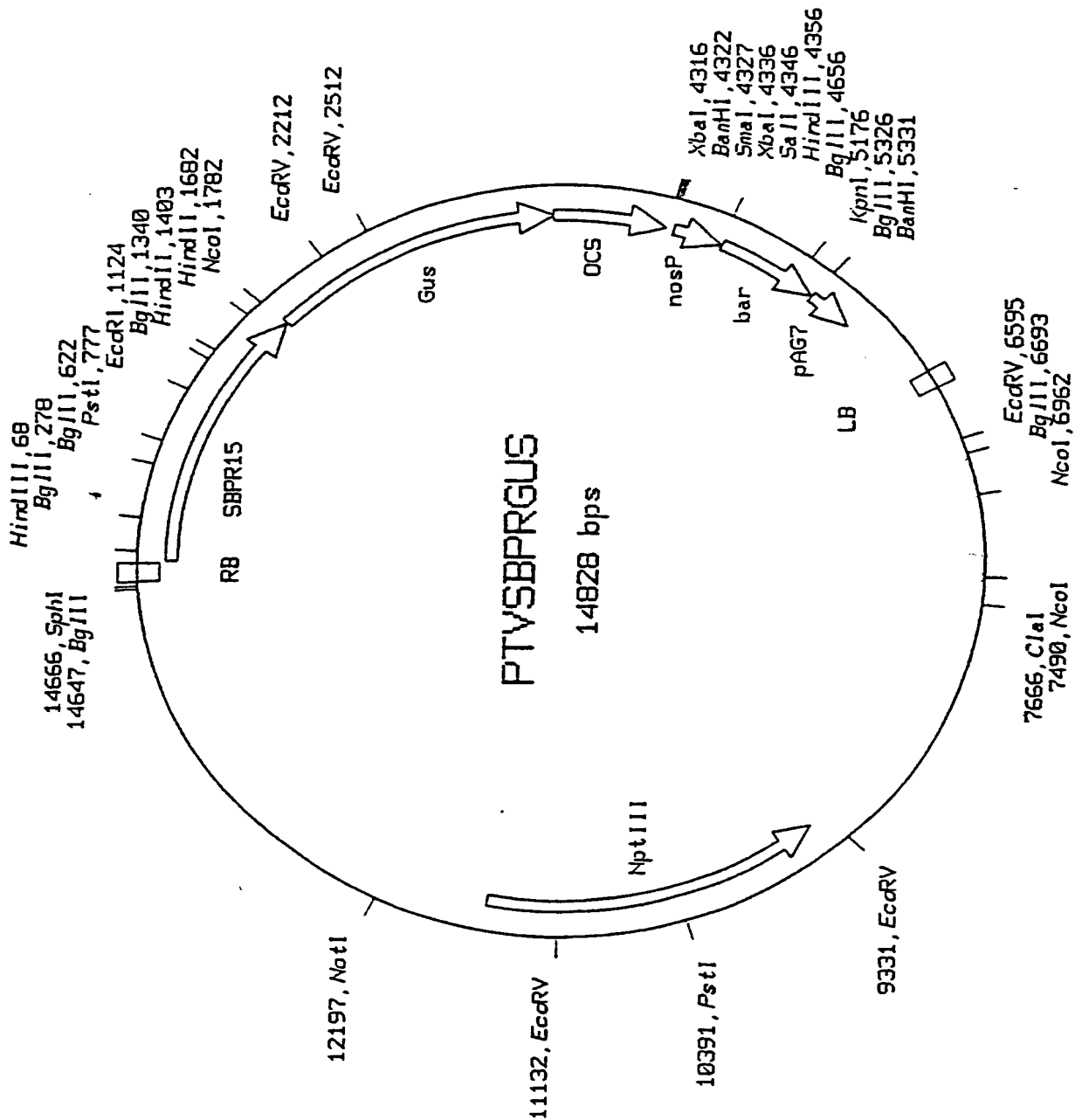


Fig. 4

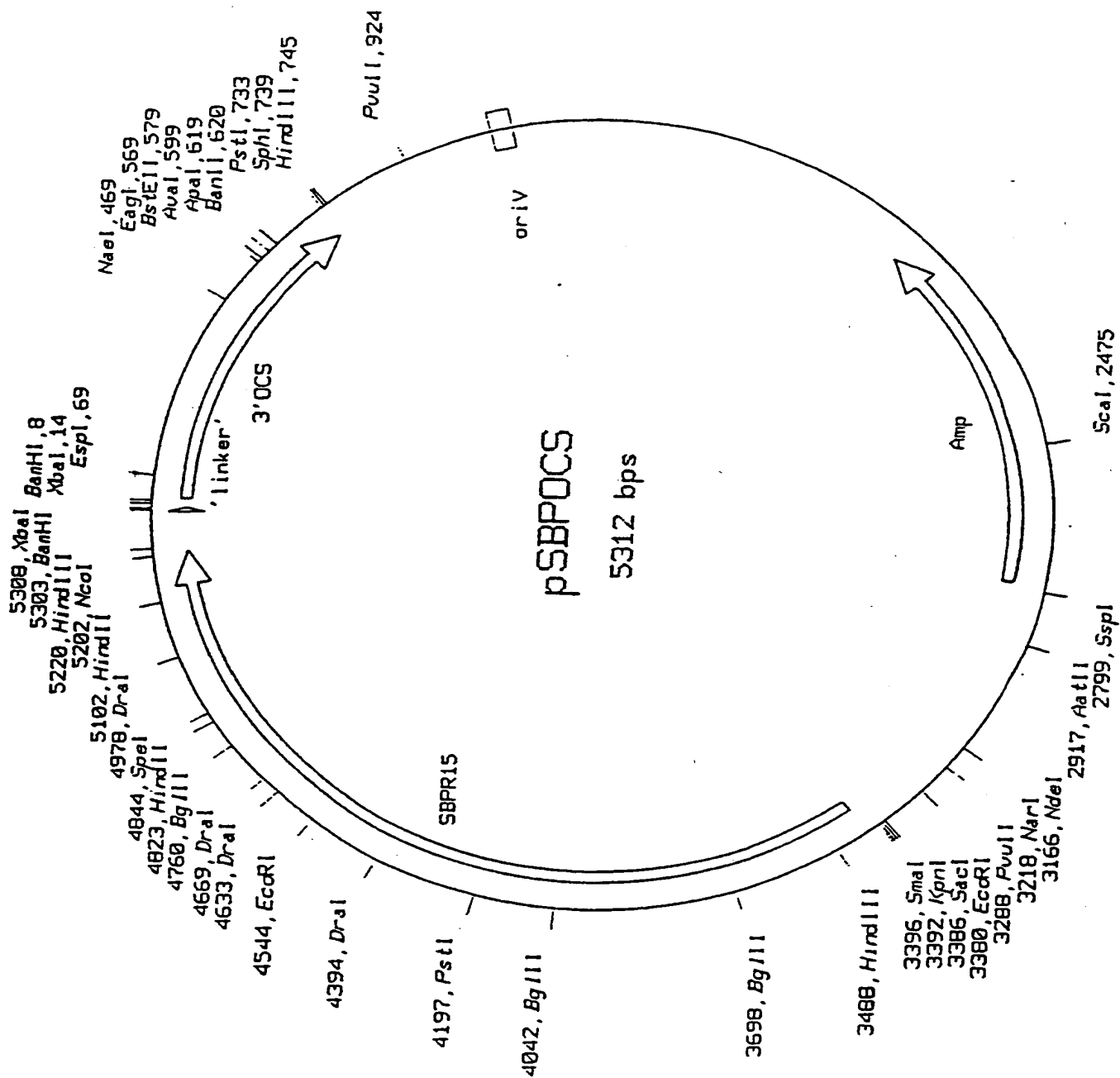


Fig. 5

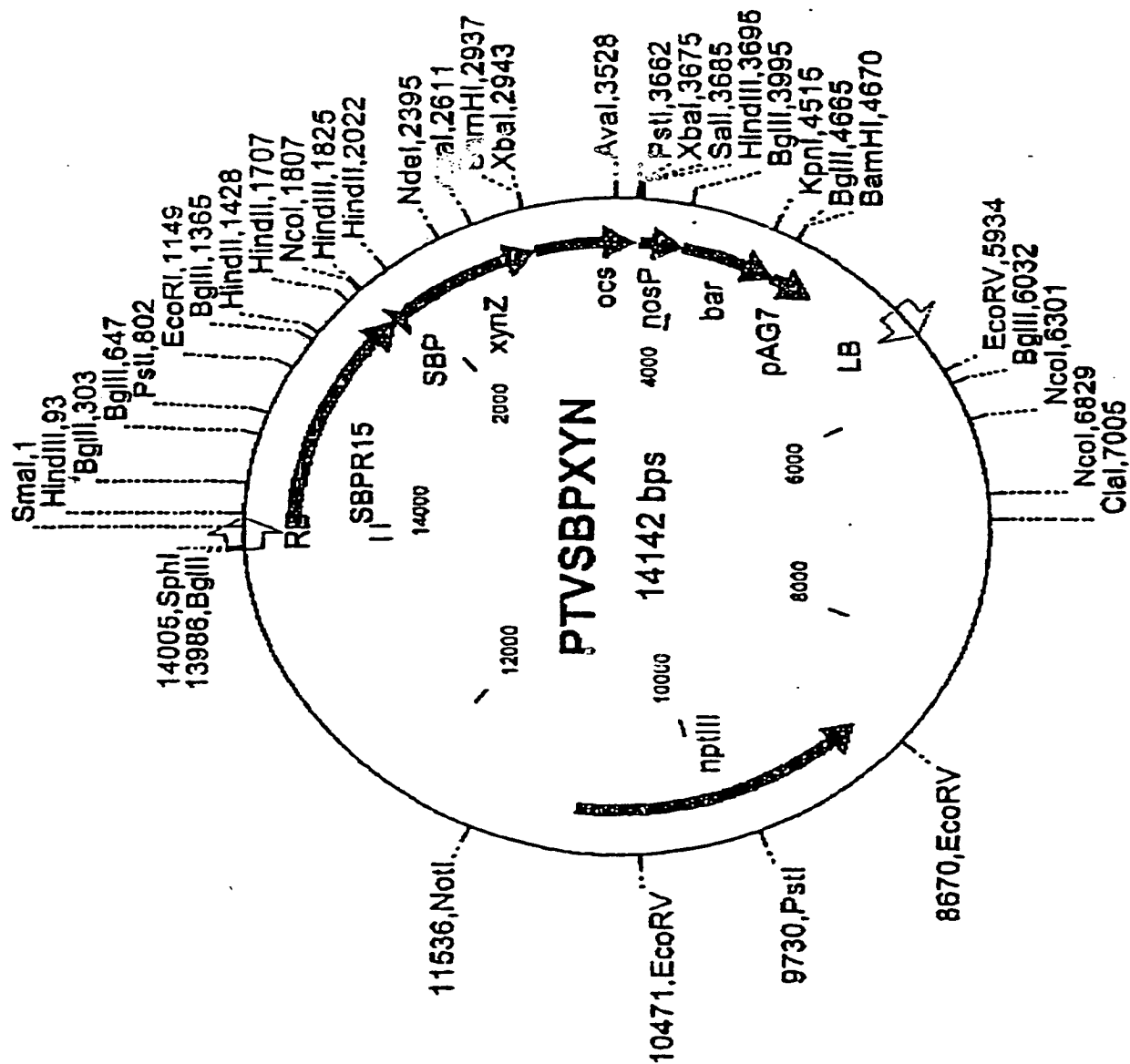
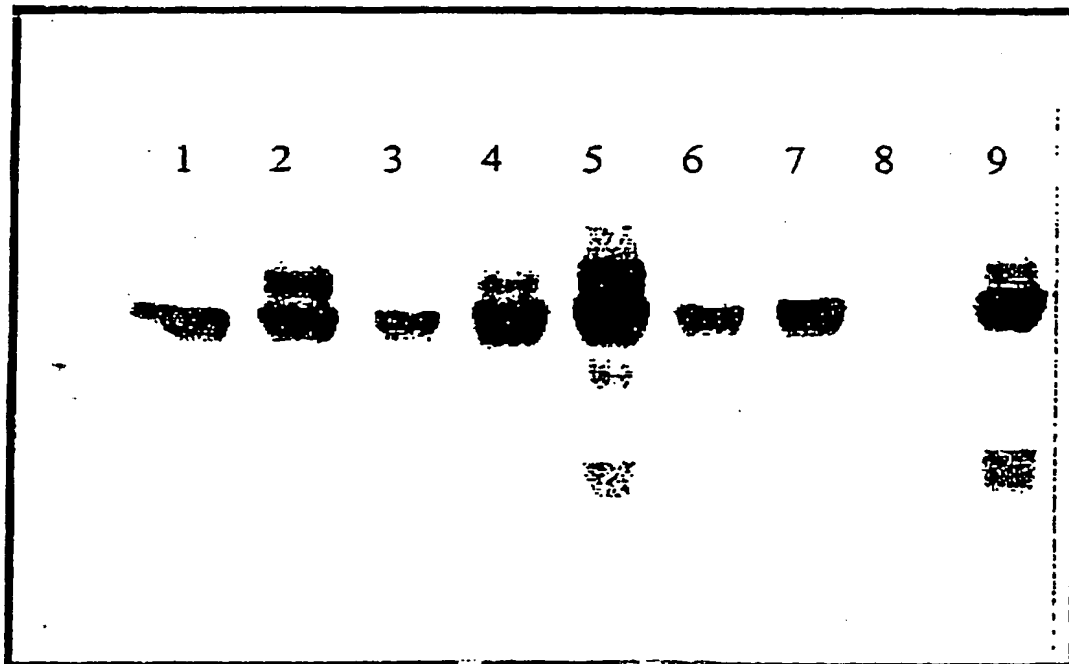


Fig. 6

*Fig. 7*

Western Blot von Proteinextrakten aus reifen  
Samen mit gegen Xylanase Z gerichteten Antikörper:

1-7 unabhängige mit dem Plasmid PTVSBPXYN  
transformierte *N. tabacum* Linien; 8 Wildtyp; 9 positiv  
Kontrolle

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/D/99/03432

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N15/63 C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>HEIM U ET AL: "Cloning and characterization of full-length cDNA encoding sucrose phosphate synthase from faba bean"</p> <p>GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, vol. 178, no. 1, 31 October 1996 (1996-10-31), pages 201-203, XP004043363</p> <p>ISSN: 0378-1119</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	<p>1,3-8, 12,13, 16,17, 19,20</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2000

Date of mailing of the international search report

26. 05. 00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No.

PCT/DE 99/03432

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GRIMES ET AL: "a 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport"</p> <p>PLANT CELL,US,AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, no. 4, 1 December 1992 (1992-12-01), pages 1561-1574, XP002079375</p> <p>ISSN: 1040-4651</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p>	<p>1,4-8, 12,13, 16,17, 19,20</p>
P,X	<p>--- WO 98 53086 A (CHAO WUN S ;GRIMES HOWARD D (US); UNIV WASHINGTON (US)) 26 November 1998 (1998-11-26)</p> <p>page 12, line 28 -page 13, line 2 page 30, line 4 -page 31, line 5</p> <p>---</p>	<p>1,3-8, 12,13, 16,17, 19,20</p>
A	<p>WO 92 18634 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 29 October 1992 (1992-10-29) the whole document</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 99/03432

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see supplemental sheet PCT/ISA 210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



Continuation of box I.2

Claims nos. 2, 9-11, 14, 15, 18 (completely); 1, 3-8, 12, 13, 16, 17, 19, 20 (partially)

Claim 2 relates to an expression cassette that is characterized by the promoter having the sequence shown in Fig. 1. No search was carried out for the subject matter of claim 2 under the terms of Rule 13ter.1c PCT since no sequence listing corresponding to WIPO Standard ST 25 was filed (Rule 5.2 PCT); the sequence is not available either in computer-readable form nor as a paper copy. The applicant failed to remedy this deficiency within the term set in the Rule 13ter.1a communication.

Claims 9 and 10 relate to plasmids that are identified by their trivial names and by their method of production. No meaningful search can be carried out without knowing the sequence of the Sall promoter fragment.

Claims 11 and 18 relate to a method for introducing an expression cassette into a plant cell and to the plant cell obtained by this method. The steps for producing the expression cassette relate to clones that are identified by their trivial names. No meaningful search can be carried out in this case.

The same applies to claims 14 and 15 that relate to the use of plasmids that are identified by their trivial names.

Claims 1, 3-8, 12, 13, 16, 17, 19 and 20 relate to expression cassettes containing a promoter of the seed protein that is analogous to the sucrose binding protein (SBP) and their use. The term "seed protein that is analogous to SBP" is not clear. The search was carried out on the basis of sucrose binding proteins.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/99/03432

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9853086 A	26-11-1998	AU 7500998 A EP 0991768 A ZA 9804322 A	11-12-1998 12-04-2000 19-01-1999
WO 9218634 A	29-10-1992	AU 669478 B AU 1468092 A CA 2106960 A EP 0580649 A JP 6506584 T US 5767363 A ZA 9202592 A	13-06-1996 17-11-1992 10-10-1992 02-02-1994 28-07-1994 16-06-1998 11-10-1993

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC./D./03432

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N15/63 C12N5/10 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HEIM U ET AL: "Cloning and characterization of full-length cDNA encoding sucrose phosphate synthase from faba bean" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, Bd. 178, Nr. 1, 31. Oktober 1996 (1996-10-31), Seiten 201-203, XP004043363 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument ---	1,3-8, 12,13, 16,17, 19,20
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&amp;\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Mai 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26. 05. 00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGEBENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GRIMES ET AL: "a 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport" PLANT CELL,US,AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, Nr. 4, 1. Dezember 1992 (1992-12-01), Seiten 1561-1574, XP002079375 ISSN: 1040-4651 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,4-8, 12,13, 16,17, 19,20
P,X	WO 98 53086 A (CHAO WUN S ;GRIMES HOWARD D (US); UNIV WASHINGTON (US)) 26. November 1998 (1998-11-26)  Seite 12, Zeile 28 -Seite 13, Zeile 2 Seite 30, Zeile 4 -Seite 31, Zeile 5	1,3-8, 12,13, 16,17, 19,20
A	WO 92 18634 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 29. Oktober 1992 (1992-10-29) das ganze Dokument	

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,  
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
**siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld 1.2

Ansprüche Nr.: 2, 9-11, 14, 15, 18 (Komplett); 1, 3-8, 12, 13, 16, 17, 19, 20 (Teilweise)

Anspruch 2 betrifft eine Expressionskassette, gekennzeichnet durch den Promoter mit der Sequenz gemäss Abb. 1. Der Gegenstand von Anspruch 2 wurde, in Übereinstimmung mit Regel 13ter.1c PCT, nicht recherchiert, da kein Sequenzprotokoll eingereicht, welches dem WIPO Standard ST 25 entsprechen würde (Regel 5.2 PCT); die Sequenz ist weder in einer Computerlesbaren Form noch als Papierkopie verfügbar. Der Anmelder hat diesen Mangel nicht innerhalb der in der Aufforderung gemäss Regel 13ter.1a festgesetzten Frist behoben.

Ansprüche 9 und 10 beziehen sich auf Plasmide, welche durch Trivialnamen sowie durch ein Herstellungsverfahren beschrieben werden. Ohne Kenntnis der Sequenz des Sall Promoterfragments kann keine sinnvolle Recherche durchgeführt werden.

Die Ansprüche 11 und 18 betreffen ein Verfahren zur Einführung einer Expressionskassette in eine Pflanzenzelle sowie die dadurch erhaltene Pflanzenzelle. Die Schritte zur Herstellung der Expressionskassette beziehen sich auf Klone, welche mit Trivialnamen identifiziert sind. Eine sinnvolle Recherche kann in diesem Fall nicht durchgeführt werden.

Analoges gilt für die Ansprüche 14 und 15, welche die Verwendung von durch Trivialnamen identifizierte Plasmide betreffen.

Die Ansprüche 1, 3-8, 12, 13, 16, 17, 19, und 20 beziehen sich auf Expressionskassetten enthaltend einen Promoter des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins und deren Verwendung. Der Begriff "SBP-ähnliches Samenprotein" ist unklar. Die Recherche wurde durchgeführt auf Basis von Saccharosebindeproteinen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel 11 PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC 1/DE /03432

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9853086 A	26-11-1998	AU 7500998 A	11-12-1998
		EP 0991768 A	12-04-2000
		ZA 9804322 A	19-01-1999
WO 9218634 A	29-10-1992	AU 669478 B	13-06-1996
		AU 1468092 A	17-11-1992
		CA 2106960 A	10-10-1992
		EP 0580649 A	02-02-1994
		JP 6506584 T	28-07-1994
		US 5767363 A	16-06-1998
		ZA 9202592 A	11-10-1993

THIS IS A BLANK (COPY)